

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

COMMUNICATION OF
INTERNATIONAL APPLICATIONS

(PCT Article 20)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Washington D.C. 20231
United States of America

Date of mailing:

08 February 1996 (08.02.96)

in its capacity as designated Office

The International Bureau transmits herewith copies of the international applications having the following international application numbers and international publication numbers:

International application no.:

PCT/EP95/02344

International publication no.:

WO95/35492

BEST AVAILABLE COPY

CORRECTED VERSION
VERSION CORRIGEE

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

03 February 1997 (03.02.97)

International application No.

PCT/EP95/02344

International filing date (day/month/year)

16 June 1995 (16.06.95)

Applicant

EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al

BEST AVAILABLE COPY

after 1st pink sheet
apparently done in

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

A. Karkachi

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

P. ENT COOPERATION TREAT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION OF THE DESIGNATED OFFICE

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 December 1996 (09.12.96)	Applicant's or agent's file reference 951019wo Me/hg
International application No. PCT/EP95/02344	Priority date (day/month/year) 17 June 1994 (17.06.94)
International filing date (day/month/year) 16 June 1995 (16.06.95)	
Applicant EIGEN, Manfred et al.	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

14 December 1995 (14.12.95)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberg Telephone No.: (41-22) 730.91.11
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------

(51) Internationale Patentklassifikation⁶:

G01N 1/00, 15/10

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/35492

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

28. December 1995 (28.12.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02344

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juni 1995 (16.06.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 22 313.7	17. Juni 1994 (17.06.94)	DE
P 44 22 290.4	25. Juni 1994 (25.06.94)	DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC
BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529
Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIGEN, Manfred [DE/DE];
Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). RIGLER,
Rudolf [DE/SE]; Handelsvägen 24, S-18 236 Dandöryd
(SE). HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-40699
Erkrath (DE).(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Deichmannhaus am
Hauptbahnhof, D-50667 Köln (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN,
CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR,
LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG,
SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE,
MW, SD, SZ, UG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-
berichts: 8. Februar 1996 (08.02.96)

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR SELECTIVELY EXTRACTING COMPONENTS FROM COMPLEX MIXTURES

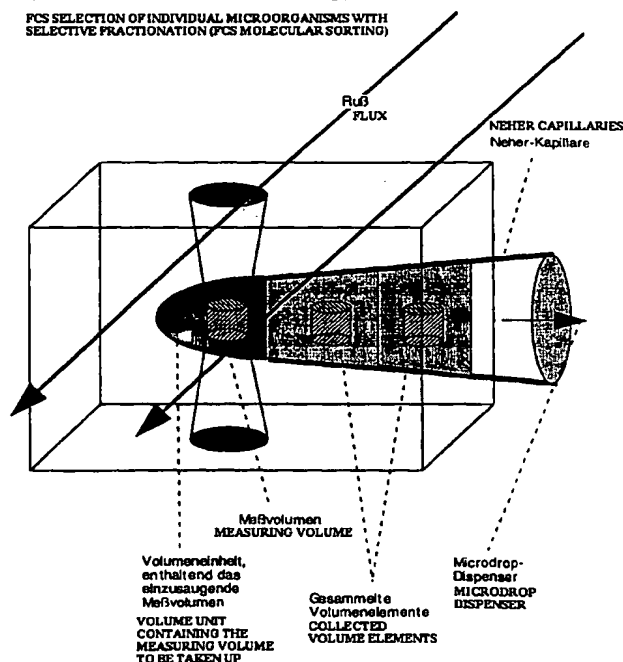
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR GEZIELTEN ENTNAHME VON KOMPONENTEN AUS KOMPLEXEN
MISCHUNGEN

(57) Abstract

The process of the invention facilitates the selective extraction of one or a few molecularly dispersed or cellular components of a system, like molecules, molecule complexes, vesicles, micells, cells, possibly with a relevant volume element V of size $10^{-9} \text{ l} \geq 10^{-18} \text{ l}$, from a larger sample volume. The required component is selectively transferred to another environment by setting the place and time of the extraction by means of a signal correlating the small component to be extracted. The process is particularly suitable for the extraction of rare components, the existence of which can be detected in a previous stage by means of a scanning process. The process is also suitable for the extraction of unidentified components.

(57) Zusammenfassung

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine gezielte Entnahme von einem oder wenigen molekulardispersen oder zellulären Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls mit einem dazugehörigen Volumenelement V der Größe $10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$ aus einem größeren Probevolumen. Der gezielte Transfer des gesuchten Bestandteiles in eine andere Umgebung geschieht durch Festlegung von Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendem Signal. Das Verfahren ist besonders geeignet zur Entnahme selten vorkommender Bestandteile, die in einem vorgelagerten Schritt durch ein Scanverfahren in ihrer Existenz nachgewiesen werden können. Das Verfahren eignet sich auch zur Entnahme an sich nicht identifizierter Bestandteile.

FCS-Selection einzelner Mikroorganismen
mit gezielter Fraktionierung
(FCS-Molekül-Sortierung)FCS SELECTION OF INDIVIDUAL MICROORGANISMS WITH
SELECTIVE FRACTIONATION (FCS MOLECULAR SORTING)

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

G01N 15/10

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/35492

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

28. December 1995 (28.12.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02344

(22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juni 1995 (16.06.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 22 313.7 17. Juni 1994 (17.06.94) DE

P 44 22 290.4 25. Juni 1994 (25.06.94) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC
BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529
Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIGEN, Manfred [DE/DE];
Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). RIGLER,
Rudolf [DE/SE]; Handelsvägen 24, S-18 236 Dandöryd
(SE). HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-40699
Erkrath (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Deichmannhaus am
Hauptbahnhof, D-50667 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN,
CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR,
LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG,
SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE,
MW, SD, SZ, UG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR SELECTIVELY EXTRACTING COMPONENTS FROM COMPLEX MIXTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR GEZIELTEN ENTNAHME VON KOMPONENTEN AUS KOMPLEXEN
MISCHUNGEN

(57) Abstract

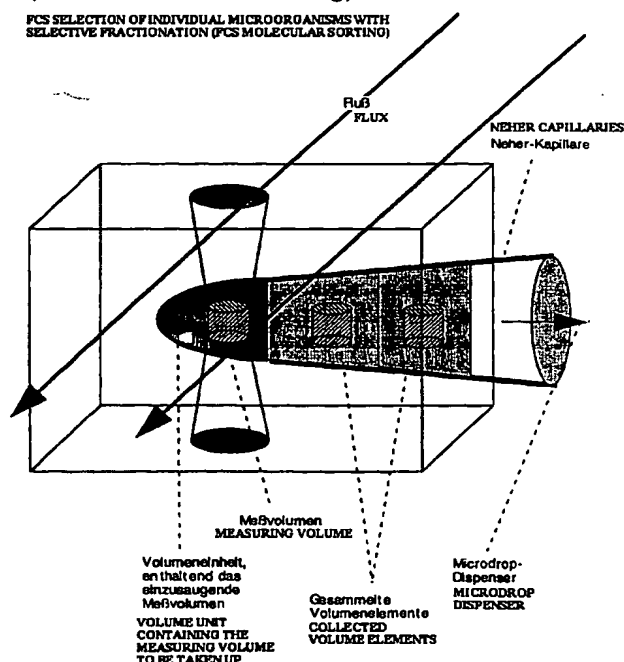
The process of the invention facilitates the selective extraction of one or a few molecularly dispersed or cellular components of a system, like molecules, molecule complexes, vesicles, micells, cells, possibly with a relevant volume element V of size $10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$, from a larger sample volume. The required component is selectively transferred to another environment by setting the place and time of the extraction by means of a signal correlating the small component to be extracted. The process is particularly suitable for the extraction of rare components, the existence of which can be detected in a previous stage by means of a scanning process. The process is also suitable for the extraction of unidentified components.

(57) Zusammenfassung

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine gezielte Entnahme von einem oder wenigen molekulardispersen oder zellulären Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls mit einem dazugehörigen Volumenelement V der Größe $10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$ aus einem größeren Probevolumen. Der gezielte Transfer des gesuchten Bestandteiles in eine andere Umgebung geschieht durch Festlegung von Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendem Signal. Das Verfahren ist besonders geeignet zur Entnahme selten vorkommender Bestandteile, die in einem vorgelagerten Schritt durch ein Scanverfahren in ihrer Existenz nachgewiesen werden können. Das Verfahren eignet sich auch zur Entnahme an sich nicht identifizierter Bestandteile.

FCS-Selection einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung (FCS-Molekül-Sortierung)

FCS SELECTION OF INDIVIDUAL MICROORGANISMS WITH
SELECTIVE FRACTIONATION (FCS MOLECULAR SORTING)



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Verfahren und Vorrichtung zur gezielten Entnahme
von Komponenten aus komplexen Mischungen**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems, eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens und dessen Anwendungen.

Die funktionale Charakterisierung einzelner Moleküle oder Molekülkomplexe, Viren oder einzelner Zellen wird mit Hilfe der in Rigler et al. (PCT/EP 94/00117) beschriebenen Verfahren möglich. Es lassen sich mit dem beschriebenen Verfahren Aussagen darüber erhalten, ob in einem komplexen Gemisch einer Lösung oder Suspension oder in einer zweidimensionalen Schicht einzelne Moleküle oder Molekülkomplexe in sehr kleinen Volumenelementen ($< 10^{-12}$ l) enthalten sind, die bestimmte Wechselwirkungen mit definierten Zielmolekülen eingehen.

Für viele analytische und synthetische Fragestellungen ist es bereits von großem Vorteil zu wissen, daß sich ein gesuchtes Molekül in einer analysierten Mischung befindet. Häufig stellt sich jedoch erfindungsgemäß zu lösende Aufgabe, das einmal als gewünscht erkannte Molekül gezielt aus dem Gemisch zu entfernen im Sinne einer präparativen An-

- 2 -

reicherung, um z.B. Klonierungsschritte zu umgehen oder vereinfachen zu können. Eine weitere Aufgabe besteht bei besonders verdünnten Lösungen einer Konzentration von 10^{-12} M in einem raschen Auffinden eines Volumenelementes als Teil des Probenvolumens, in dem sich ein Vertreter der gesuchten Substanz befindet. Die gesuchte Substanz muß dabei keinesfalls bekannt sein. Bei der Suche nach unbekannten Pathogenen oder Wirkstoffen sind eventuell nur Wechselwirkungen zu bekannten Substanzen bekannt, oder es können Wechselwirkungen zu eventuell anwesenden Nachweismolekülen postuliert werden.

Zur Entnahme ganzer Zellen sind Verfahren und Vorrichtungen beschrieben. Die entsprechenden Vorrichtungen sind als Zell-Sorter bekannt. Es lassen sich aufgrund bestimmter Parameter der Lichtstreuung oder Fluoreszenz z. B. bestimmte Zell-Typen eines Blutbildes identifizieren und die Zellen einer definierten Spezifikation auszählen. Die Zellen lassen sich mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern anfärben und aufgrund ihrer Oberflächen-Antigene differenzieren oder über Hybridisierungsverfahren (in situ) über ihren Nukleinsäuregehalt klassifizieren. Nach einer Vereinzelung in Tröpfchen werden die Zellen im Durchfluß analysiert und können durch gezielte elektrostatische Ablenkung einzelner Tropfen selektiv ausgesondert bzw. fraktioniert werden. Entsprechende Geräte werden kommerziell angeboten und sind für klinische Diagnostik und Forschung von großer Bedeutung. PCT/EP 93/03077 offenbart, wie aus einem kapillaren Fluß einzelne, linear getrennte Volumenelemente separiert werden können.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das es ermöglicht, aus einem größeren Volumenelement eines Probenvolumens einer Lösung oder Suspension an definierten Raumkoordinaten, ein kleines Volumenelement der Lösung oder Suspension zu entnehmen, wobei dieses Volumenelement eine Zielsubstanz enthält. Ein solches kleines Volumenelement kann durch Einsatz von Analyse-

- 3 -

verfahren definiert werden, wie sie in der Anmeldung Rigler et al. (PCT/EP 94/00117) beschrieben sind. Hierbei werden äußerst kleine Meßvolumina als Teil eines größeren, umgebenden Probevolumens analysiert, indem durch konfokale Ausleuchtung eines Volumenelementes, Anregung durch das zur Ausleuchtung verwendeten Lichts und/oder Registrierung spezifischer Fluoreszenzsignale auf die Anwesenheit bestimmter Inhaltsstoffe geschlossen wird. Die Ausleuchtung kann alternativ z.B. auch durch die Methode der Nahfeldspektroskopie geschehen, wobei Blenden mit Öffnungen verwendet werden, die kleiner sind als die Wellenlänge der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung. Es soll die auch Aufgabe gelöst werden, aufgrund der spektralen Eigenschaften einer gesuchten, nachgewiesenen Substanz, ein bestimmtes Molekül, ein Molekülkomplex oder eine Zelle, diese gezielt zu entnehmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in besonders vorteilhafter Weise zum Nachweis bislang nicht identifizierter unbekannter Pathogene oder Immunogene eingesetzt werden. (unbekannter) Pathogene oder Immunogene können charakterisiert und gegebenenfalls präparativ dargestellt werden. Eine besonders vorteilhafte Vorgehensweise im Sinne der Erfindung nutzt die Tatsache, daß Pathogene sich nach erfolgter Infektion eines Wirtsorganismus zunächst vermehren, ohne durch eine präsente Immunabwehr daran gehindert zu werden. Erst nach Ablauf einer bestimmten Periode etabliert die Immunabwehr eine humorale Immunantwort z. B. durch die Synthese verschiedener Immunglobuline (vornehmlich IgM, gefolgt von IgG) und später eine zelluläre Immunantwort. Patienten mit Verdacht auf eine erfolgte Infektion oder auf Kontakt mit einem bisher unbekannten Pathogen oder Immunogen ohne Detektierbarkeit bekannter Antigen-Eigenschaften bezüglich einer Reaktion und Detektierbarkeit mit bekannten Antisera/Antikörpern, stellen das Ausgangsmaterial für die Pathogenisolierung dar. Zu einem späteren Zeitpunkt, in der Phase des chronischen Erkrankungsstadiums, wird davon ausgegangen, daß

- 4 -

sich inzwischen Antikörper gegen das vermeintliche Pathogen, z.B. ein Virus, gebildet haben, der Virustiter dadurch allerdings inzwischen stark erniedrigt ist. Seren aus diesem Erkrankungsstadium dienen zur Präparation der Immunglobuline.

Die Fraktion der Immunglobuline enthält im Normalfall nur zu einem untergeordneten Prozentsatz Antikörper, die gegen das unbekannte Pathogen gerichtet sind. Die Mehrzahl der Antikörper richtet sich gegen eine Vielzahl von nicht mit dem gesuchten spezifischen Pathogen/Immunogen im Zusammenhang stehenden Antigenstrukturen. Deshalb ist es schwieriger, das Pathogen über den Immunkomplex durch Verwendung von Seren eines einzigen Patienten zu charakterisieren.

Der gesuchte Immunkomplex läßt sich jedoch durch Hinzuziehung einiger erwarteter Charakteristika isolieren:

- Der Immunkomplex enthält den massenmäßig bestimmenden Hauptanteil eines Pathogens, dessen Beweglichkeit zwischen der eines kleinen RNA Virus und der eines Bakteriums liegt.
- Das Pathogen hat mehrere antigene Bindestellen, die mit mehr als einem Farbstoff-markierten Antikörper besetzt sind.

In einer bevorzugten Vorgehensweise lassen sich (Figur 5) die Antikörper aus zwei Patienten im Zustand der hypothetisch chronischen Phase getrennt präparieren und mit unterschiedlichen oder über Kreuzkorrelation unterscheidbaren Farbstoffen markieren. Es werden dabei die mindestens zwei Patienten danach ausgewählt, daß eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, daß beide Patienten sich mit demselben Pathogen infiziert haben. Da Pathogene in der Regel eine große Anzahl der antigenen Determinante auf der Oberfläche/Virushülle tragen, ist es wahrscheinlich, daß die gebildeten Immunkomplexe nach der Reaktion mit einem Gemisch der unterschiedlich

- 5 -

markierten Antiseren gleichzeitig die verschiedenen, markierenden Farbstoffe aufweisen.

Experimentell wird vorgegangen, wie es in Figur 5 dargestellt ist.

Detektion einzelner Bakterien über die Bindungsspezifitäten von oberflächen-exprimierenden Bakterien

Für eine große Anzahl wichtiger Anwendungen der modernen biotechnologischen Forschung wäre es äußerst vorteilhaft und effizient, könnte in einem Verfahren anstelle der Detektion eines funktionalen Biomoleküls in einem gegebenen Probenvolumen die Detektion eines einzelnen Bakteriums oder eines Virus mit funktionalen Oberflächenproteinen erfolgen. Der entscheidende Vorteil liegt in der interessanten Kopplung eines phänotypischen Expressionsproduktes, z.B. eines natürlichen oder eines rekombinanten Oberflächenproteins an dessen genetischen Bauplan. Das Verfahren ist insbesondere im Zusammenhang mit einem erfindungsgemäßen präparativen Einsatz zu sehen, durch den als gewünscht bestimmte Zellen oder Molekülkomplexe aus einer Umgebung ausgesondert werden können.

Bestimmung und präparative Gewinnung der immunogenen Epitope von Mikroorganismen

Das Genom von Mikroorganismen umfaßt ca. 10^7 Nukleotide. Durch Shotgun-Expression lassen sich mit dem beschriebenen Verfahren subgenische Fragmente einer durchschnittlichen Länge von 100 Aminosäuren exprimieren. Unter Berücksichtigung der Leserahmenvariation (Faktor 3) und eines angenommenen nicht kodierenden Gegenstranges enthalten 10^8 rekombinante Bakterienklone jedes Segment ca. 100fach. 10^8 rekombinante Bakterienklone sind in 1 ml einer Suspension von 1 OD enthalten, die sich in ca. 24 Stunden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einzeln z.B. auf ihre Binde-

- 6 -

eigenschaften mit IgE oder IgE tragenden Zellen aus einem Allergie-Patienten untersuchen lassen. Erfindungsgemäß werden die entsprechend charakterisierten Bakterien ausgesondert, zumindest jedoch stark angereichert, biologisch expandiert oder das entsprechende Genomsegment durch enzymatische Amplifikationsverfahren amplifiziert und charakterisiert.

Falls ein entsprechendes Bakterium im Meßvolumenelement detektiert wird, kann es erfindungsgemäß unmittelbar aus dem Gemisch entfernt werden, indem das Bakterium/Molekülkomplex umgebende Volumenelement durch eine Kapillare abgesogen wird oder der Molekülkomplex durch Elektrophorese, Elektroosmose oder Dipolinduktion abgetrennt wird (Figuren 1 und 2).

Ein der Erfindung zugrundeliegender Erfindungsgedanke ist, daß eine elektrisch, optisch oder mechanisch gesteuerte Absaugvorrichtung eingesetzt wird, deren Öffnungsdimension groß ist gegenüber dem Meßvolumen, aber klein gegenüber der Dimensionierung des Probevolumens, um das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem zu lösen. Erfindungsgemäß wird das elektrische, optische oder mechanische Pumpsystem durch einen FCS-gesteuerten Impulsgeber gesteuert, so daß ein kleiner Anteil des Probevolumens so von dem Gesamtvolumen abgetrennt wird, daß eine Rückdiffusion weitgehend ausgeschlossen werden kann. Dies geschieht entweder durch Elektrophorese, induzierte Dipolmomente, Elektroosmose, mechanisch induzierte Drucksprünge oder durch Lichtdruck.

Das Verfahren erlaubt die Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls eingebettet in einem dazugehörigen Volumenelement (Entnahmevolumen) V ($10^{-9} \text{ l} \geq V \geq 10^{-18} \text{ l}$). Dieses Volumenelement ist Teil eines größeren Volumens einer Umgebung, die die zu entnehmenden kleinen Bestandteile enthält (Probevolumen). Die Entnahme erfolgt durch Transfer des Bestandteiles oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Ent-

nahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendes Signal einer Analyse festgelegt wird. Als Analyseverfahren kommen solche Verfahren in Frage, bei denen der molekulare Inhalt kleinster Volumenelemente (10^{-14} l) analysiert werden können, wie dies durch das in der internationalen Anmeldung Rigler et al. PCT/EP 94/00117 beschrieben ist. Das Probenvolumen ist mit Aufnahmevorrichtung durch eine Pore einer Kapillare oder einer Pore einer Membranhaut verbunden, deren engste Öffnung D durch $100 \mu\text{m} \geq D \geq 0,1 \mu\text{m}$ gegeben ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird hierzu eine Kapillare eingesetzt, wie sie bei Neher et al., Methods in Enzymology, Vol. 207, 3 - 14 beschrieben ist. Diese Kapillare ist z.B. mit einer Fördereinrichtung, wie eine Pumpe verbunden, die in der Lage ist, das den Molekülkomplex umgebende Lösungsvolumen abzusaugen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Einsatz eines mechanisch, lichtdruck- oder elektrisch gesteuerten Absaugsystems oder eines (Piezo/-Solenoid-) -pumpen gesteuerten Dispensersystems.

Es lassen sich mehrere Entnahmen in ein oder mehreren Schritten in ein und dieselbe Aufnahmevorrichtung durchführen, wobei die einzelnen Entnahmevorgänge jeweils unabhängig voneinander im Sinne eines Sammelvorganges erfolgen können.

In vielen Fällen ist die elektrisch gesteuerte Entnahme über einen gerichteten Transport des Volumenelementes durch mindestens einen elektrischen Spannungs- oder Feldimpuls bevorzugt. Andere Ausführungsformen arbeiten mechanisch durch mindestens einen Druckdifferenzpuls und/oder durch mindestens einen Lichtdruckpuls, in Richtung auf die Porenöffnung mit Verfahren, wie sie z.B. von Weber und Greulich, Int. Rev. Cytol., 1992, 133, pp. 1 - 41, publiziert wurden. Die Aufnahmevorrichtung kann eine Kapillare sein, deren Lumen vorzugsweise größer ist als der Durchmesser der Pore oder

Kapillarenspitze, deren Öffnung mit dem Probevolumen in direktem Kontakt steht. In durchgängig dünnen Kapillaren kann Elektroosmose durchgeführt werden, wie es in der Kapillarelektrophorese üblich ist, bei mechanischem Volumentransport könnte ansonsten der Strömungswiderstand unvorteilhaft groß werden.

Im Falle einer elektrisch vermittelten Entnahme wird vorzugsweise der gewünschte Bestandteil im Meßvolumen gezielt über einen elektrischen Feldimpuls über das mindestens einmalige, kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes, zum Zweck einer Elektrophorese elektrisch geladener Bestandteile und/oder zum Zweck einer Elektroosmose mit gekoppeltem Transport elektrisch neutraler Moleküle, in die Aufnahmevorrichtung transferiert. Eine Elektrode kann dazu mit der Lösung auf Seiten des Probevolumens elektrisch leitend in Kontakt gebracht, die andere Elektrode auf Seiten der Aufnahmevorrichtung elektrisch leitend mit der Lösung in Kontakt gebracht und der leitende Kontakt zwischen beiden Kompartimenten über die Pore hergestellt werden. Bei der Entnahme über einen gezielten Druckpuls wird durch mindestens einmalige kurzzeitige Erhöhung des Druckes im Volumen außerhalb des Aufnahmekompartimentes im Vergleich zum Druck innerhalb des Aufnahmekompartimentes der gewünschte Transport bewirkt und/oder durch eine kurzzeitige Druckminderung innerhalb des Aufnahmekompartimentes. Hierbei haben sich an sich bekannte Dispenser (Microdrop) oder Pump/Saugvorrichtungen bewährt (Solenoid-Pumpen, Schrittmotor-gesteuerte Pumpen). Damit können kleine Volumenelemente von ≤ 1 nl aus einem größeren Volumen einer Lösung oder Suspension durch Transfer des kleinen Volumenelementes durch eine Pore eines Durchmessers $\leq 100 \mu\text{m}$ in ein Aufnahmekompartiment transferiert werden, wobei der Zeitpunkt und die Raumkoordinate des Entnahmevorgang über ein korreliertes Analysesystem wie durch die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) gesteuert wird.

- 9 -

Insbesondere durch einen Unterdruckpuls über ein piezogesteuertes Dispensiermodul, dessen Füllvolumen sich innerhalb des Aufnahmekompartimentes befindet und/oder durch einen Druckpuls und/oder Unterdruckpuls wird bewirkt, daß das Volumen der Aufnahmevorrichtung vergrößert wird oder das Probevolumen zugunsten der Aufnahmevorrichtung verkleinert wird. Erfindungsgemäß folgt der Transport in das Aufnahmevolumen. Die Größe des aufgenommenen Volumens wird über die Anzahl der dispensierten Tropfen oder der Schrittmotorschritte oder über die Länge und Intensität des Lichtdruckpulses gesteuert.

Das Hardware-/Software-gekoppelte on line-arbeitende Analysesystem triggert über das aufgenommene, korrelierende Signal den Entnahmezeitpunkt. Die Entnahme erfolgt in dem Moment, wenn sich der oder die zu entnehmende Partikel mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb des Entnahmevolumens befindet. Dies muß nicht unbedingt annähernd zeitgleich mit dem erhaltenen positiven Analyseergebnis erfolgen. Wenn ein Molekül, Molekülkomplex, Virus oder Zelle durch FCS als zu entnehmender Bestandteil identifiziert wurde, besteht die Möglichkeit der direkten Entnahme oder einer späteren Entnahme. Dabei wird die Annahme zugrundegelegt, daß der jeweilige zu entnehmende Bestandteil

- entweder kurz nach der erfolgten Messung durch erzwungenen Transport wie beschrieben oder elektrophoretische Wanderung sich zu einem definierten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort aufhält und da gemäß Figuren 1 und 2 elektrophoretisch oder mechanisch präparativ abgetrennt werden kann, oder
- ohne erzwungene Translation sich noch in der Nähe des Detektionsvolumens aufhält, aus dem der Bestandteil elektrophoretisch, optisch durch Lichtdruck oder mechanisch abgetrennt werden kann.

- 10 -

Handelsübliche Zellsortierer sind mit einem System zur Vereinzelung von Zellen nach vorheriger Analyse ausgestattet, das sich erfindungsgemäß mit dem analytischen Verfahren der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie koppeln läßt. Üblicherweise werden Zellen in einer Flüssigkeit ummantelten, kapillaren Fluß durch eine Küvette geleitet, die mit einer konventionellen Fluoreszenzmeßvorrichtung und/oder einer Lichtstreuemeßvorrichtung gekoppelt ist. Im definierten räumlichen und zeitlichen Abstand nach der Meßvorrichtung wird am Ende der Kapillare durch eine angelegte kontinuierliche Schallfrequenz für eine normierte und kontinuierliche Zerteilung des dünnen Flüssigkeitsstrahles in einzelne austretende Tröpfchen gesorgt. Im Falle, daß eine Zelle eines gewünschten Zelltyps die Küvette passiert, befindet sich diese Zelle nach einer definierten Zeit in einem dieser Tröpfchen, das nach der Vereinzelung durch ein gekoppeltes Signal z.B. mittels eines Puls im elektrostatischen Feld gezielt aus seiner Flugbahn abgelenkt werden kann und so in einer separaten Aufnahmevorrichtung abgetrennt werden kann. Der Nachteil der Methode liegt darin begründet, daß im strömenden Fluß nur ein integrales Fluoreszenzsignal im Sinne einer reinen Intensitätsmessung erhalten werden kann. Im Gegensatz dazu ermöglicht die erfindungsgemäße Kopplung mit der Methode der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie in kleinen Volumenelementen, eine Differenzierung der erhaltenen Fluoreszenzsignale nach Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Molekülgrößen und Molekülbeweglichkeiten. Dies ist erforderlich, um z.B. Rezeptor-gebundene Liganden von anwesenden freien Liganden zu unterscheiden. Erfindungsgemäß wird die Methode der fluoreszenzkorrelations-spektroskopischen Nachweisttechnik von fluoreszierenden Partikeln wie Molekülen, Vesikeln, Zellen oder Molekülkomplexen im mechanisch induzierten, kapillaren Fluß mit einer gezielten Sortiervorrichtung durch eine Pore eingesetzt.

Der eigentliche Trennvorgang kann hierbei nach dem Durchtritt einzelner Volumenelemente durch die Pore stattfinden, indem

- 11 -

nach definierter räumlicher und zeitlicher Korrelation die positiv registrierten Meßvolumina mit einem zugehörigen Volumenelement in getrennte Aufnahmevorrichtungen überführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der FCS-Meßvorgang auch vor dem Austritt aus der Pore einer Kapillarenspitze erfolgen, die mit einer Mikrodispensiervorrichtung gekoppelt ist und wobei durch verschiedene mechanische oder Feld-induzierte Ablenkungen kleine Meßvolumina mit einem zugehörigen Volumenelement der Umgebung als Tröpfchen in verschiedenen Aufnahmevorrichtungen aufgefangen werden.

Insbesondere erfolgt die zeitliche und/oder ortsspezifische Korrelation zwischen einer Analyse eines Subvolumens des Probevolumens (Meßvolumen) innerhalb des Volumenelementes V und einer Entnahme eines gewünschten Bestandteiles durch Entnahme des Volumenelementes V Hardware-/Software-gestützt. Sie wird vorgenommen, wobei sich mindestens ein Bestandteil, das im Volumenelement V positiv identifiziert wurde, beim Entnahmevorgang im aufgenommenen Volumenelement V befindet. Dabei wird die Pore der Aufnahmevorrichtung mechanisch an das Volumenelement herangeführt und/oder das Volumenelement V oder Bestandteile davon mit vorbestimmter zeitlicher Korrelation über einen Transport im Fluß oder über elektrostatische oder magnetische Feldgradienten oder Bestandteile davon an die Pore des Aufnahmekompartimentes mit zeitlicher Korrelation transportiert. Die Analyse kann auch unmittelbar vor der Pore des Aufnahmekompartimentes erfolgen. Vorzugsweise ist das Subvolumen (Meßvolumen) kleiner als das Volumenelement V. Damit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß der positiv identifizierte Bestandteil entnommen wird, bevor er sich zu weit aus seinem Meßvolumen entfernt hat.

Das Analyseverfahren muß bestimmte Anforderungen erfüllen, um im Verfahren eingesetzt werden zu können. Das zum Entnahmevorgang korrelierende Signal wird z. B. über ein

- 12 -

optisches Analysesystem ermittelt, das spezifische Moleküleigenschaften in kleinen Volumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysieren kann. Dies geschieht vorzugsweise durch Analysensysteme auf der Basis der konfokalen Laser-Korrelationsspektroskopie oder Fluoreszenzkorrelationsanalytik auf der Basis der Nahfeldspektroskopie, dessen Signal on line und Software-gesteuert zeitlich einen gezielten Entnahmevorgang steuert. Gekoppelte Analyse- und Entnahmevorgänge lassen sich erfindungsgemäß kaskadenförmig aneinanderreihen, wobei die aufgenommenen Proben volumina mit oder ohne Verdünnungsschritt nachfolgend wiederum einer Analyse ausgesetzt werden und wiederum in angereicherter Form durch eine zweite und/oder weitere Entnahmeeinheit nach erfolgter Analyse entnommen werden.

Es lassen sich solche Bestandteile entnehmen, die mit mindestens einem Reaktionspartner einen Komplex bilden, der spektroskopisch erfaßt werden kann (indirekt) oder selbst hinreichende Fluoreszenzeigenschaften (direkt) aufweisen.

Von besonderem Interesse ist das Verfahren in Kombination mit der erfindungsgemäßen Vorgehensweise zur Entnahme noch nicht identifizierter (unbekannter) Pathogene. Ziel ist die Vermehrung eines isolierten Pathogens in vivo oder die Vermehrung des genetischen Materials des Pathogens oder Teilen davon in vitro durch Amplifikation der enthaltenen Nukleinsäure im Sinne eines Shot-Gun Verfahrens und Charakterisierung über Sequenzierung.

Bedeutsam ist auch die gezielte Entnahme von Bestandteilen, die bislang bezüglich ihrer molekularen Natur nicht bekannt sind, wie Moleküle, Zellen, Vesikel, Molekülkomplexe, die sich funktionell z. B. über eine enzymatische Wirkung oder eine Komplexbildung identifizieren lassen.

Wie in Figur 5 skizziert werden erfindungsgemäß unbekannte Partikel, wie Pathogene oder Immunogene, entnommen, indem

- 13 -

Seren von mindestens einem Organismus gewonnen werden, der mit dem nicht identifizierten Pathogen infiziert ist. Dabei wird mindestens ein Serum (Serum 1) aus der Phase einer akuten Infektion durch das bislang unbekannte Pathogen oder Immunogen gewonnen und mindestens ein weiteres Serum (Serum 2) aus demselben oder mindestens einem weiteren Organismus mit gleicher oder homologer Infektion aus der Phase der chronischen Infektion gewonnen. Das unbekannte Pathogen oder Immunogen aus Serum 1 wird mit mittelbar oder unmittelbar Fluoreszenz-Farbstoff-markierten Antikörpern aus Serum 2 zur Komplexbildung gebracht und der gebildete Komplex gemessen. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Kreuzkorrelation, wie in PCT/EP 94/00117 beschrieben, über die z.B. die gleichzeitige Bindung verschieden fluoreszierender Liganden wie Antikörper aus unterschiedlichen Organismen gemessen werden kann. Die Markierung von Antikörpern kann unmittelbar über mindestens eine Reaktion mit kopplungsfähigen Farbstoffen oder mittelbar durch Reaktion mit Farbstoff-markierten, Antikörper-Bindedomänen, insbesondere Protein A-Derivaten oder Protein G-Derivaten erfolgen. Die nicht identifizierten pathogenen Bestandteile können sich als an sich bekannte Mikroorganismen herausstellen. Als Merkmal werden spezifische Wechselwirkungen oder enzymatische Aktivitäten mit Fluoreszenz-markierten Zielmolekülen zu oberflächen-exprimierten oder cytosolisch-exprimierten Strukturelementen natürlicher oder genetisch rekombinierter Proteine oder Peptide detektiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann die Erfassung von Molekülen in sehr niedriger Konzentration bewirken. Zum Beispiel kann das Scanning von foetalen Zellen im mütterlichen Blut durchgeführt werden. Mit der erfindungsgemäßen Methode lassen sich sehr niedrige Konzentrationen ($< 10^{-12}M$) fluoreszierender Moleküle bestimmen. Das Verfahren kann jedoch unpraktikabel werden, wenn zu lange bei unveränderten Raumkoordinaten zur Festlegung eines oder mehrerer Meßvolumen gewartet werden muß, bis ein gesuchtes Molekül das Raum-

- 14 -

element des Meßvolumens passiert. Dieses Problem stellt sich auch bei höheren Konzentrationen ein ($> 10^{-12}$ M), wenn die Diffusionszeiten sehr klein sind, wie dies z.B. bei Zellen und zellgebundenen Molekülen der Fall ist. In solchen Fällen kann das erfindungsgemäße Verfahren so modifiziert werden, daß dem eigentlichen Meßverfahren ein Scanning-Prozeß vorgeschaltet ist, bei dem solange die Raumkoordinaten in zeitlich kontinuierlicher Meßtechnik oder zeitlich diskontinuierlicher Meßtechnik variiert werden, bis ein Signal der gewünschten Qualität erfaßt wird. Dies kann z. B. das gemeinsame Auftreten einer korrelierten Fluoreszenz mit zwei verschiedenen Emissionen bei Verwendung der Kreuzkorrelationsmethode sein. Ist ein Signal erfaßt, wird der FCS-Meßvorgang gestartet. Die Dauer eines Scanning-Vorgangs kann weniger als eine Millisekunde pro Meßvorgang betragen. Schon dann ist feststellbar, daß das "gescannte" Meßvolumen oder die parallel vermessenen Meßvolumina den gesuchten Bestandteil nicht beinhalten. Bei dieser Vorgehensweise ist zu beachten, daß die durchschnittlichen charakteristischen Diffusionszeiten in ihrer absoluten Größe auf berechenbare Weise beeinflußt werden. Dies geschieht zum Beispiel so, daß fixierte Moleküle (z.B. auf fixierten Bakterienzellen) direkt und ausschließlich die zeitliche Variation der relativen Veränderung der Raumkoordinaten des Meßvolumens im Vergleich zu den Koordinaten des Probevolumens wiedergeben, oder bei beweglichen kleinen Molekülen und sprunghafter Veränderung der Raumkoordinaten ca. die Hälfte der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer, da die Moleküle sich bei Beginn des Meßvorgangs bereits innerhalb des Meßvolumens befinden.

Scanning-Prozesse, die der eigentlichen Messung vorgeschaltet sind, erlangen dann Bedeutung, wenn z. B. Zellpopulationen analysiert werden sollen, wobei nur ein Bruchteil der Zellen Moleküle oder Molekülkomplexe die die Entnahme bestimmenden Eigenschaften tragen. Dies ist z.B. bei der Analyse evolutiv hergestellter Mutantenpopulationen rekombinanter Zellen der Fall, aber auch bei der Analyse mütterlichen Blutes auf die

- 15 -

Anwesenheit kindlicher, kernhaltiger Erythrozyten, die auf bestimmte Erbanlagen oder Chromosomenanomalien analysiert werden sollen.

Das Verfahren eignet sich für eine Methode, die im folgenden als funktionale Genextraktion bezeichnet wird. Gemeint ist die Herstellung genetischer Sonden zur Auffindung/Detektion/-Klonierung spezifischer Funktionen, die auf einem Gesamtgenom oder in einer cDNA-Bank kodiert sind. Anwendungsbeispiele sind die funktionale Genomanalyse durch Verwendung von Phagen- oder Bakterien-Displaysystemen, sowie entsprechende Anwendungen in der evolutiven Biotechnologie. In beiden Beispielen geht es um die Detektion und gezielte Selektion von Zellen oder Phagen mit spezifischen Bindungseigenschaften zu bestimmten Liganden vor einem Hintergrund nicht-reagierender Phagen oder Bakterien.

Die Anzahl durchgemusterter Volumenelemente steigt somit erheblich. In Kombination mit der Kreuzkorrelation lassen sich somit im μ s- bis Nanosekundenbereich im Einzel und Multiarraybetrieb viele Volumenelemente durchmustern. Die Verschiebung wird nur unterbrochen, wenn sich im erfaßten Volumenelement z.B. verschiedenfarbige miteinander korrelierte Signale nachweisen lassen. Liegt diese Situation vor, können stoffliche Parameter der Bestandteile, z.B. die Translationsdiffusion, bestimmt werden. Diese Zeit ist um ein zu errechnendes Zeitelement (ca. 50%) statistisch kürzer, verglichen mit dem Fall, daß ein Teilchen in das Volumenelement von sich aus oder durch erzwungene Diffusion eindringen muß. Ist ein Teilchen einmal erfaßt, kann es auch durch Scanning der unmittelbaren Umgebung ein zweites Mal erfaßt werden.

Erfindungsgemäß kann das Meßvolumen sich aus parallel ausgeleuchteten Untermeßvolumina zusammensetzen, indem die gleichzeitige Ausleuchtung mehrerer Meßvolumina durch mindestens eine Strahlenquelle für elektromagnetische Strahlung durch

- 16 -

Verwendung mindestens eines holographischen Gitters zur Erzeugung mehrerer Volumenelemente erfolgt.

Die parallele Ausleuchtung mehrerer Volumenelemente mit konfokaler Optik ist in DE 40 35 799 beschrieben. Parallele Ausleuchtung von Meßvolumina, deren relative Abstände im sub- μm -Bereich liegen, gelingt durch die beschriebenen Vorrichtungen nicht oder nur unbefriedigend. Die im erfindungsgemäßen Verfahren bereitzustellenden Ausleuchtungen mit einer Dimensionierung im unteren μm -Bereich und darunter gelingen durch Verwendung holographischer Gitter.

Umfangreiche Arrays kleiner Volumenelemente können durch Einsatz holographischer Gitter ausgeleuchtet werden. Die Meßvolumina werden erfindungsgemäß konfokal entweder über die Verwendung mehrerer Lochblenden in Objektebene, durch Positionierung von Multiarraydetektor-elementen in Objektebene oder durch Einsatz von Lichtfaserbündeln mit Einkopplung des Lichtes in Objektebene und Übertragung auf Photonen-Detektoren auf Fluoreszenzeigenschaften darin enthaltener Moleküle vermessen.

Bei der hochparallelisierten Ausleuchtung von kleinen Volumenelementen stellt sich das Problem der Registrierung der emittierten Fluoreszenzsignale aus den einzelnen Volumenelementen. In der Patentanmeldung PCT/EP 94/00117 ist beschrieben, daß es möglich ist, parallel kleine Raumelemente auszuleuchten und die jeweiligen Fluoreszenzsignale individuell durch die Verwendung konfokaler Lochblendensysteme in Objektebene auf Multiarraydetektoren abzubilden oder die Signale an der Position und anstelle der Lochblenden in Lichtleiter einzukoppeln und auf Detektorelemente zu leiten oder die Multiarraydetektoren anstelle und in der Position der der Lochblenden selbst zu positionieren. Es wird auch die Möglichkeit beschrieben, ein größeres Volumenelement auszuleuchten und mit den oben beschriebenen konfokalen,

- 17 -

parallelen Abbildungen kleiner Untervolumenelemente zu kombinieren.

Bei hoher Parallelisierung werden jedoch die Anforderungen an die Anzahl der Detektorarrays sowie an den mit der parallelen Verarbeitung auflaufenden Daten verbundenen Rechenaufwand erheblich. Erfindungsgemäß werden diese Probleme dadurch gelöst, daß in einer weiteren Form der Kopplung kleiner, parallel ausgeleuchteter Raumelemente mit einer Registriervorrichtung die Signale über mehrere Raumelemente hinweg integriert erfaßt werden. Diese Vorgehensweise ist insbesondere bei solchen Anwendungen von Nutzen, bei denen

- eine Vielzahl von Volumenelementen durchgemustert werden sollen,
- der Rechenaufwand zugunsten der eingesetzten Rechenkapazität und der Rechendauer minimiert werden soll,
- die Anzahl der pro Messung erfaßten Volumenelemente und somit das vermessene Gesamtvolumen maximiert werden soll,
- Signale von Molekülen, Molekülkomplexen oder Zellen in hoher Verdünnung analysiert werden sollen,
- die Präzision der orts aufgelösten Erfassung von untergeordneter Bedeutung ist,
- die Anzahl der ausgesandten Lichtquanten während der Diffusion durch ein einzelnes Raumelement für eine Korrelation ausreichend ist.

Erfindungsgemäß werden mindestens zwei Meßvolumina bei der Signalregistrierung in Objektebene gemeinsam oder in Gruppen zusammengefaßt auf mindestens ein Detektorelement eines photonenregistrierenden Meßsystems konfokal abgebildet.

Zur Erfassung fluoreszierender Moleküle in sehr niedriger Konzentration wird das Probevolumen erfindungsgemäß vor der eigentlichen Messung und Entnahme mindestens eines Bestand-

teiles einem Scanning-Prozeß unterworfen, wobei durch kontinuierliche oder diskontinuierliche zeitliche Variation der Raumkoordinaten des Meßvolumens, relativ zu den Raumkoordinaten des Probevolumens, die Zeit zur Erfassung eines gesuchten Teilchens verkürzt wird. Das Zeitintervall δt für die Messung eines oder mehrerer Volumenelemente mit definierten Raumkoordinaten vor einer Erfassung eines gesuchten Moleküls über sein Fluoreszenz-Meßsignals ist dabei kürzer als die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gesuchten Moleküls innerhalb eines Meßvolumens.

Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Pore einer porösen Aufnahmevorrichtung dicht an das optische Meßvolumen herangeführt wird und die Aufnahmevorrichtung mit einer mechanisch, optisch oder elektrisch steuerbaren Entnahmevorrichtung verbunden ist. Sie umfaßt die Anordnung eines geschlossenen oder offenen Behältnisses zur Aufnahme eines Probevolumens, gekoppelt mit einer Meßvorrichtung zur Ausleuchtung und/oder Messung eines kleinen Volumenelementes (Meßvolumen) durch elektromagnetische Strahlung und mindestens einer Verbindung zu mindestens einem zweiten Volumenelement in einer Aufnahmevorrichtung, das mit dem Probevolumen durch eine Öffnung in direktem Kontakt über eine flüssige Phase steht, wobei die Öffnung dem Meßvolumen vorzugsweise räumlich unmittelbar benachbart ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet besondere Verwendung zur präparativen Gewinnung unbekannter Pathogene, Immunogene oder Organismen, die Teile eines Genoms funktional exprimieren, sowie zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut.

Derartige Probleme stehen im Zusammenhang mit Verfahren zur evolutiven Optimierung von Peptiden und/oder Proteinen durch Einsatz von Mutagenese-Verfahren und Selektions-Verfahren, wie sie beispielsweise in der internationalen Patetanmeldung

- 19 -

PCT/EP 94/00117 vorgeschlagen werden. Es lassen sich ca. 10^9 Bakterien in ihren Bindungseigenschaften zu spezifischen Farbstoff-markierten Substanzen innerhalb von 24 Stunden durchmustern z.B. auf die Anwesenheit eines Bakteriums, das ein Oberflächenprotein/Peptid exprimiert, das die Fähigkeit besitzt, mit dem Zielmolekül von vorgegebener Konzentration in Wechselwirkung zu treten. Das entsprechende Bakterium ist aus einem solchen Reaktionsansatz mit herkömmlichen Methoden klonierbar bzw. mit dem erfindungsgemäßen Verfahren direkt isolierbar.

Ein weiteres bedeutendes Anwendungsfeld ergibt sich aus dem sogenannten Genomprojekt zur funktionalen Kartierung von Gen-segmenten aus genomischen Banken, cDNA Banken oder Banken subgenischer Strukturelemente (Shape Space). Auf diese Weise lassen sich genomische und/oder subgenomische Segmente aus umfangreichen Kollektiven in ihrer Funktion, z.B. ihrem funktionalen Bindeverhalten zu Zielmolekülen bestimmen.

Die Verwendung der beschriebenen Methodik der funktionalen Zuordnung genetisch kodierter Peptidsegmente kann insbesondere in der allergologischen Forschung große Bedeutung erlangen. Die Zuordnung von immundominanten Epitopen auf Allergenen (z.B. Aspergillus, Milchprotein, alpha-Amylase) ist von außerordentlich großer Bedeutung und bislang ein schwer zu lösendes Problem. Typische Probleme der Praxis sind:

- Bestimmung der IgE-bindenden Moleküle aus einem zumeist undefinierten Substanzgemisch. Bedeutsam ist beispielsweise die Beantwortung der Frage, welche Bestandteile des Sojalecithins immunogen sind, die Reinsubstanz allein, die Reinsubstanz in ihrer Wechselwirkung mit Verunreinigungen des Präparates oder die Wechselwirkung mit Strukturen des Empfängerorganismus. Erfindungsgemäß lassen sich die unterschiedlichen immunogenen Sub-

- 20 -

stanzen in der Mischung mit markiertem IgE aus Patienten differenzieren.

- Durch Expression subgenischer Gensegmente lassen sich
 - mit dem oben genannten Verfahren die immun-dominanten Epitope eingrenzen, charakterisieren und präparativ darstellen. Mit diesen Ergebnissen lassen sich
 - mit den in DE 41 12 440 C2 beschriebenen Methoden evolutiv analoge, funktionale Moleküle erzeugen, denen die entsprechenden Immundominanten Regionen fehlen, z.B. eine abgeschwächt immunogene alpha--Amylase oder Waschmittel-Proteasen,
- die spezifischen Epitope nach Standardmethoden einfach gentechnisch darstellen und als reine Nachweisreagenzien einsetzen oder zur Desensibilisierung verwenden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren lassen sich bestimmte Aufgaben lösen, die bislang nicht oder nur durch unverhältnismäßig großen Aufwand lösbar gewesen sind.

- Screening von pharmakologisch aktiven Substanzen über die Bindung bekannter Fluoreszenz-markierter Liganden an an sich unbekannte Rezeptoren, die sich auf Zellen oder natürlichen oder künstlichen Vesikel-Strukturen befinden können.

Es gibt natürliche und chemisch synthetisierte Wirkstoffe mit pharmakologischer Wirksamkeit, deren Zielmoleküle nicht bekannt sind. Die Zielmoleküle können dabei extrazelluläre Moleküle sein (z.B. Protease-Hemmer), Oberflächen-Membran--Rezeptoren (z.B. Insulin), lösliche Rezeptoren als Mediatoren (steroidhormonbindende Rezeptoren) oder zelluläre lösliche Strukturproteine oder Enzyme.

- 21 -

Erfindungsgemäß läßt sich somit die äußerst wichtige Aufgabe lösen, zu einem bekannten Wirkstoff das pharmakologisch wichtige Zielmolekül zu finden, zu charakterisieren und gegebenenfalls zu präparieren:

- Orphan-Rezeptor-Suche
- Aufklärung pharmakologischer Wirkmechanismen
- Suche nach analogen Wirkstoffen
- Suche und Differenzierung unterschiedlicher Rezeptormoleküle, vorzugsweise in differenzierbaren biologischen Targets (unterschiedliche Zelldifferenzierung, Tumor/non-Tumor), krankheitsassoziiert - nicht krankheitsassoziiert etc.

Legende der Figuren

Figur 1

(Molekülsammler)

Die schematische Zeichnung beschreibt das Prinzip der Vorrichtung, bei der durch eine Pore, die die offene Verbindung zwischen den Kompartimenten A und B darstellt, durch einen Druck- oder Unterdruckpuls oder einen elektrischen Puls die Inhaltsstoffe aus einem kleinen Volumenelement aus dem Kompartiment A in ein Kompartiment B überführt werden kann. Ein Teil dieses Volumenelementes ist das dunkel symbolisierte Meßvolumen von $< 10^{-14}$ l unmittelbar vor der Pore, in dem die FCS-Analyse stattfindet. Eine Zelle oder ein makromolekularer Komplex läßt sich auch durch einen entsprechend gerichteten Lichtdruck mittels eines Laserpulses erreichen, der senkrecht zum Porendurchmesser erfolgt und zum Transport eines als gewünscht erkannten Komplexes in die Aufnahmevorrichtung des Kompartiment B geführt werden kann.

- 22 -

Figur 2

(FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung)

Die Figur zeigt die erfindungsgemäße FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung aus einem kontinuierlich oder diskontinuierlich bewegten Probevolumen. Das FCS-Meßvolumen befindet sich unmittelbar vor der Öffnung einer kapillaren Pore und ist durch die schraffierte Säule im Fokussierungskegel der FCS-Laserausleuchtung oder Nahfeldausleuchtung gekennzeichnet. Jeweils in kosekutiven Schritten lassen sich rechnergesteuert als positiv identifizierte Meßvolumina gemeinsam mit einem umgebenden Volumen aus der Probevorrichtung in die Aufnahmevorrichtung transportieren. Dies gelingt z. B. durch Anschluß einer Microdrop-Dispenservorrichtung oder z.B. in einfacher Ausführung durch Ankopplung einer schrittmotorgesteuerten Spritze (nl-Aufnahme/Schritt) oder einen elektrischen Puls. So können während einer Messung mehrere Volumenelemente in der Aufnahmevorrichtung akkumuliert werden.

Figur 3

(Kaskadenanreicherung)

Durch seriellles Aneinanderschalten von Trennvorrichtungen, wie sie in Figur 2 beschrieben sind, läßt sich die Trennleistung steigern. Dies ist beispielsweise bedeutungsvoll, wenn aus einem hochkomplexen Gemisch (10^{12} Partikel) von z. B. rekombinaten Bakterien oder Phagen in hoher Konzentration einzelne Partikel möglichst hintergrundsfrei ausgesondert werden sollen.

Figur 4

(FCS-Selektion einzelner Mikroorganismen)

- 23 -

Die Abbildung beschreibt eine Vorrichtung, mit der Bakterien aus Gemischen ausgesondert werden können, die bestimmte, durch FCS zu messende Eigenschaften exprimieren. Es wird einem kapillaren Fließsystem ein zunächst nicht induziertes Bakteriengemisch zugeführt. In einer Mischkammer wird beispielsweise IPTG als ein expressionsinduzierendes Reagenz zugeführt. Nach hinreichend langer Flußzeit wird dem Expressionsprodukt ein Assay-System mit Markermolekülen zugeführt, die sich anschließend an einer definierten Position in ihrer Wechselwirkung mit einem etwaigen Expressionsprodukt messen lassen. Die Abbildung soll darüber hinaus andeuten, daß ein positiv identifiziertes Meßvolumen auch an einer räumlich und zeitlich entfernten Position abgenommen werden kann, sofern die Raum/Zeit-Koordinaten in einem bekannten und definierten Verhältnis zueinander stehen.

Figur 5

(Nachweis und Präparation neuer Pathogene)

Die Abbildung demonstriert die erfindungsgemäße Vorgehensweise bei der Selektion von unbekannten Pathogenen, die sich durch Kreuzkorrelation mittels FCS detektieren lassen, wobei die unterschiedlich markierten Antikörper, die gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet sind, vorzugsweise aus unterschiedlichen Patienten stammen können.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems wie Moleküle, Molekülkomplexe, Vesikel, Micellen, Zellen, gegebenenfalls mit einem dazugehörigen Volumenelement (Entnahmevolumen) V , $10^{-9} \geq V \geq 10^{-18}$ l, aus einem größeren Volumen einer die zu entnehmenden kleinen Bestandteile enthaltenen Umgebung (Probevolumen) durch Transfer des Bestandteiles oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden kleinen Bestandteil korrelierendes Signal festgelegt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch (gekennzeichnet, daß das Probevolumen mit der anderen Umgebung in Form einer Aufnahmevorrichtung durch eine Pore einer Kapillare oder Membranwandung verbunden ist, deren engste Öffnung D durch $100 \mu\text{m} \geq D \geq 0,1 \mu\text{m}$ gegeben ist.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 und/oder, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Entnahme in ein oder mehreren Schritten in ein und dieselbe Aufnahmevorrichtung erfolgt, wobei die einzelnen Entnahmevorgänge jeweils unabhängig voneinander nach Art eines Sammelvorganges erfolgen.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme über einen gerichteten Transport des Volumenelementes durch mindestens einen elektrischen Spannungs- oder Feldimpuls erfolgt und/oder mechanisch durch mindestens einen Druckdifferenzpuls und/oder durch mindestens einen Lichtdruckpuls.

- 25 -

5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmevorrichtung eine Kapillare ist, deren Lumen größer ist als der Durchmesser der Pore oder Kapillarenspitze, deren Öffnung mit dem Probevolumen in direktem Kontakt steht.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 5 dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen elektrischen Feldimpuls über das mindestens einmalige, kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes zum Zweck einer Elektrophorese elektrisch geladener Bestandteile und/oder zum Zweck einer Elektroosmose mit gekoppeltem Transport elektrisch neutraler Moleküle erfolgt, indem eine Elektrode mit der Lösung auf Seiten des Probevolumens elektrisch leitend in Kontakt steht und die andere Elektrode auf Seiten der Aufnahmevorrichtung elektrisch leitend in Kontakt steht mit der Lösung und der leitende Kontakt zwischen beiden Kompartimenten über die Pore hergestellt wird.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen mechanischen Druckimpuls durch mindestens einmalige kurzzeitige Erhöhung des Druckes im Volumen außerhalb des Aufnahmekompartimentes im Vergleich zum Druck innerhalb des Aufnahmekompartimentes entsteht und/oder durch eine kurzzeitige Druckminderung innerhalb des Aufnahmekompartimentes.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß der Unterdruckpuls durch ein piezo-gesteuertes Dispensiermodul entsteht, dessen Füllvolumen sich innerhalb des Aufnahmekompartimentes befindet und/oder daß der Druckpuls und/oder Unterdruckpuls dadurch erfolgt, daß durch vorzugsweise Schrittmotor gesteuerte Hubänderung einer gekoppelten Kolbenspritzenvorrichtung

- 26 -

das Volumen der Aufnahmevorrichtung vergrößert wird oder das Probenvolumen zugunsten der Aufnahmevorrichtung verkleinert wird.

9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 6 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe des aufgenommenen Volumens über die Anzahl der dispensierten Tropfen oder der Schritte des Schrittmotors gesteuert wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß das korrelierende Signal den Entnahmezeitpunkt triggert, der in dem Moment erfolgt, wenn sich das oder die zu entnehmende Partikel mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb des Entnahmenvolumens befindet.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 10 dadurch gekennzeichnet, daß die zeitliche und/oder ortsspezifische Korrelation zwischen einer Analyse eines Subvolumens des Probenvolumens (Meßvolumen) innerhalb des Volumenelementes V und einer Entnahme eines gewünschten Bestandteiles durch Entnahme des Volumenelementes V Rechner/Software-gestützt vorgenommen wird, wobei sich mindestens ein Bestandteil, das im Volumenelement V analysiert wurde, beim Entnahmevorgang im aufgenommenen Volumenelement V befindet, wobei die Pore der Aufnahmevorrichtung mechanisch an das Volumenelement herangeführt wird und/oder das Volumenelement V oder Bestandteile davon mit vorbestimmter zeitlicher Korrelation über einen Transport im Fluß oder über elektrostatische oder magnetische Feldgradienten oder Bestandteile davon an die Pore des Aufnahmekompartimentes zeitlich korreliert transportiert wird und/oder die Analyse geometrisch unmittelbar vor der Pore des Aufnahmekompartimentes erfolgt.

- 27 -

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Subvolumen (Meßvolumen) kleiner als das Volumenelement V ist.
13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, daß das korrelierende Signal über ein optisches Analysesystem ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften in kleinen Volumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysieren kann, insbesondere Analysensysteme auf der Basis der konfokalen Laser-Korrelationsspektroskopie oder auf der Basis der Nahfeldspektroskopie, dessen Signal on line und Software gesteuert zeitlich einen gezielten Entnahmevorgang steuert.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 13, dadurch gekennzeichnet, daß die gekoppelten Analyse- und Entnahmevorgänge kaskadenförmig aneinandergereiht werden, wobei die aufgenommenen Probenvolumina mit oder ohne Verdünnungsschritt nachfolgend wiederum einer Analyse ausgesetzt werden und wiederum in angereicherter Form durch eine zweite und/oder weitere Entnahmeeinheit nach erfolgter Analyse entnommen werden können.
15. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile entnommen werden, die mit mindestens einem Reagens einen Komplex bilden, der spektroskopisch erfaßt werden kann.
16. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile entnommen werden, die bislang nicht bezüglich ihrer molekularen Natur bekannt sind, Moleküle, Zellen, Vesikel, Molekülkomplexe, die sich über eine Wechselwirkung mit bekannten Strukturen oder Wirkungen wie enzymatische Wirkung oder eine Komplexbildung identifizieren lassen.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die unbekannten Partikel Pathogene oder Immunogene sind, die gezielt entnommen werden, indem Seren von mindestens einem Organismus gewonnen werden, wobei mindestens ein Serum (Serum 1), aus der Phase einer akuten Infektion durch ein auch bislang nicht identifiziertes (unbekanntes) Pathogen oder Immunogen gewonnen wird und mindestens ein Serum (Serum 2) aus demselben oder mindestens einem weiteren Organismus mit gleicher oder homologer Infektion aus der Phase der chronischen Infektion gewonnen wird, wobei das auch unbekannte Pathogen oder Immunogen aus Serum 1 mit mittelbar oder unmittelbar fluoreszenz-markierten Antikörpern aus Serum 2 zur meßbaren Komplexbildung gebracht wird.
18. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 - 17 dadurch gekennzeichnet, daß über Kreuzkorrelation die gleichzeitige Bindung von Liganden mit unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen, z. B. markierte Antikörper aus unterschiedlichen Organismen, bestimmt wird.
19. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 - 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung der Antikörper unmittelbar über mindestens eine Reaktion mit kopplungsfähigen Farbstoffen oder mittelbar durch Reaktion mit Farbstoff-markierten, Antikörper-Bindedomänen, insbesondere Protein A-Derivaten oder Protein G-Derivaten erfolgt.
20. Verfahren gemäß mindestens einen der Ansprüche 1 - 19 dadurch gekennzeichnet, daß die auch unbekannten Partikel an sich bekannte Mikroorganismen, oder Vesikel sind, wobei als Merkmal spezifische Wechselwirkungen oder enzymatische Aktivitäten mit fluoreszenz-markierten Zielmolekülen zu oberflächen-exprimierten oder cytosolisch-exprimierten Strukturelementen natürlicher

- 29 -

oder genetisch rekombinierter Proteine oder Peptide detektiert werden.

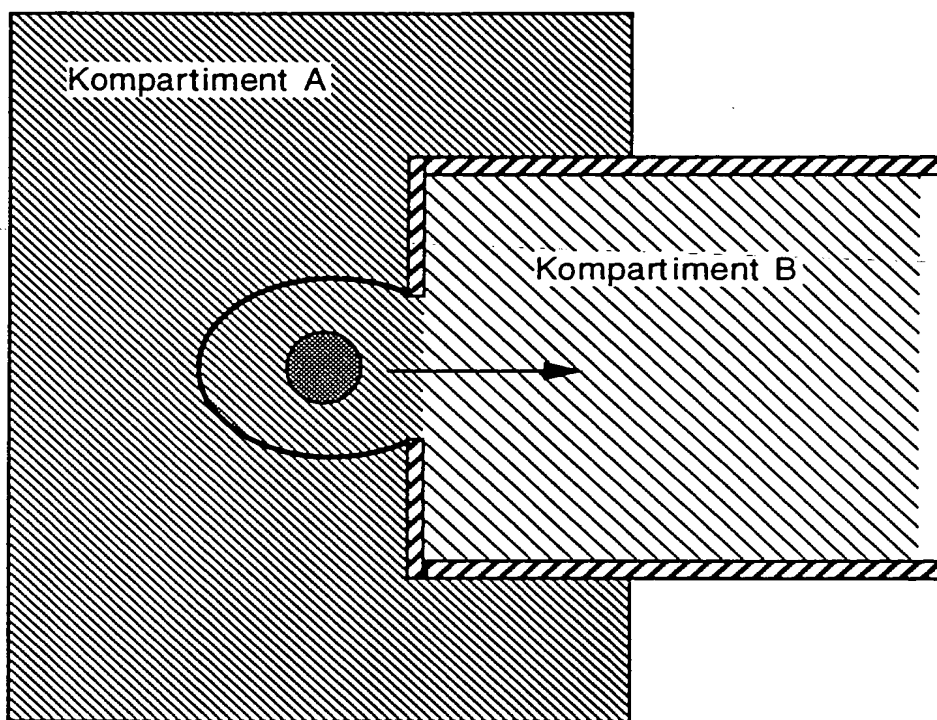
21. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen sich aus parallel ausgeleuchteten Untermeßvolumina zusammensetzt, wobei die gleichzeitige Ausleuchtung mehrerer Meßvolumina durch mindestens eine Strahlenquelle für elektromagnetische Strahlung durch Verwendung mindestens eines holographischen Gitters erfolgt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Registrierung von Fluoreszenzsignalen aus mindestens einem Meßvolumen durch konfokale Abbildung durch Verwendung einer Mehrzahl konfokaler Lochblenden in Objektebene oder Einkopplung der Signale in Lichtleiter in der Objektebene oder durch Multiarray-detektoren in Objektebene erfolgt.
23. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 - 22, dadurch gekennzeichnet, daß zur Durchführung parallelierter Messungen an mindestens zwei Meßvolumina bei der Signalregistrierung in Objektebene mindestens zwei Meßvolumina gemeinsam oder in Gruppen zusammengefaßt auf mindestens ein Detektorelement eines Photonenregistrierenden Meßsystems konfokal abgebildet werden.
24. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 23, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung fluoreszierender Moleküle in sehr niedriger Konzentration das Probevolumen vor der eigentlichen Messung und Entnahme mindestens eines Bestandteiles einem Scanning-Prozeß unterworfen wird, wobei die Zeit zur Erfassung eines gesuchten Teilchens verkürzt wird, indem die Raumkoordinaten des Meßvolumens relativ zu den Raumkoordinaten des Probevolumens zeitlich diskontinuierlich oder kontinuierlich variiert werden.

- 30 -

25. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Zeitintervall δt für die Messung eines oder mehrerer Volumenelemente mit definierten Raumkoordinaten vor einer Erfassung eines gesuchten Moleküls über sein Fluoreszenz-Meßsignal kürzer ist als die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gesuchten Moleküls innerhalb eines Meßvolumens.
26. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 - 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Pore einer Aufnahmevorrichtung dicht an das Meßvolumen herangeführt wird, die Aufnahmevorrichtung mit einer mechanisch, optisch oder elektrisch steuerbaren Entnahmevorrichtung verbunden ist.
27. Vorrichtung gemäß Anspruch 26, bestehend aus einer Anordnung eines geschlossenen oder offenen Behältnisses zur Aufnahme eines Probevolumens, gekoppelt mit einer Meßvorrichtung zur Ausleuchtung und/oder Messung eines kleinen Volumenelementes (Meßvolumen) durch elektromagnetische Strahlung und mindestens einer Verbindung zu mindestens einem zweiten Volumenelement, das mit dem Probevolumen durch eine Öffnung in direktem Kontakt über eine flüssige Phase steht, wobei die Öffnung dem Meßvolumen vorzugsweise räumlich unmittelbar benachbart ist.
28. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 27, zur präparativen Gewinnung nicht identifizierter Pathogene, Immunogene oder Organismen, die Teile eines Genoms funktional exprimieren.
29. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25 zur Herstellung genetischer Sonden zur Auffindung/Detektion/Klonierung funktionalen Elemente eines Gesamtgenoms und/oder davon abgeleiteter Diagnostika und/oder Therapeutika.

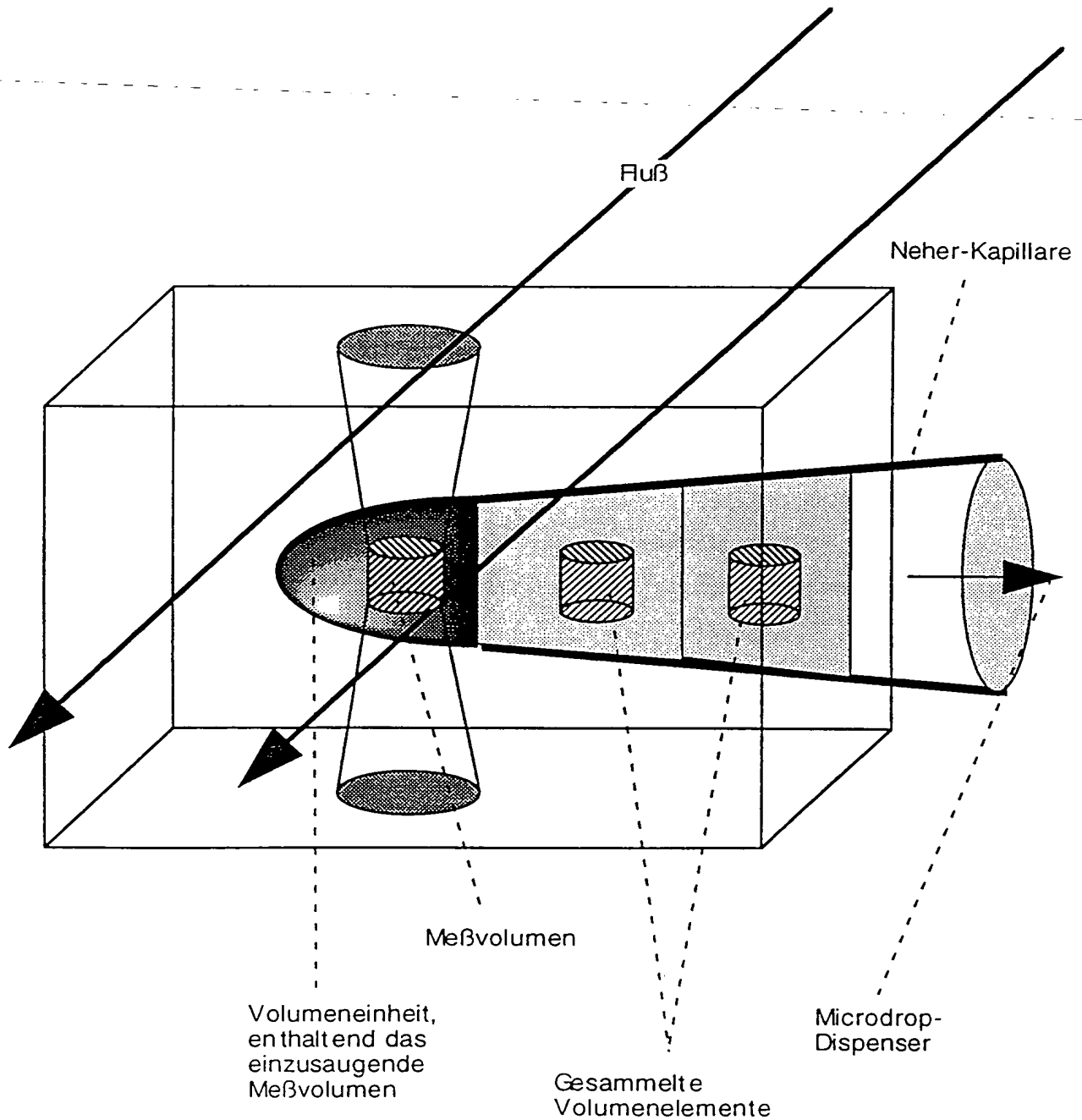
- 31 -

30. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut.
31. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Detektion und präparativen Gewinnung mindestens eines spezifischen Gens eines Mikroorganismus, dessen mindestens ein Genprodukt auf der inneren oder äußeren Zellmembran oder Virushülle präsentiert ist.
32. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 - 25, zur Funktionsbestimmung von Genprodukten definierter Gensegmente.



FIGUR 1

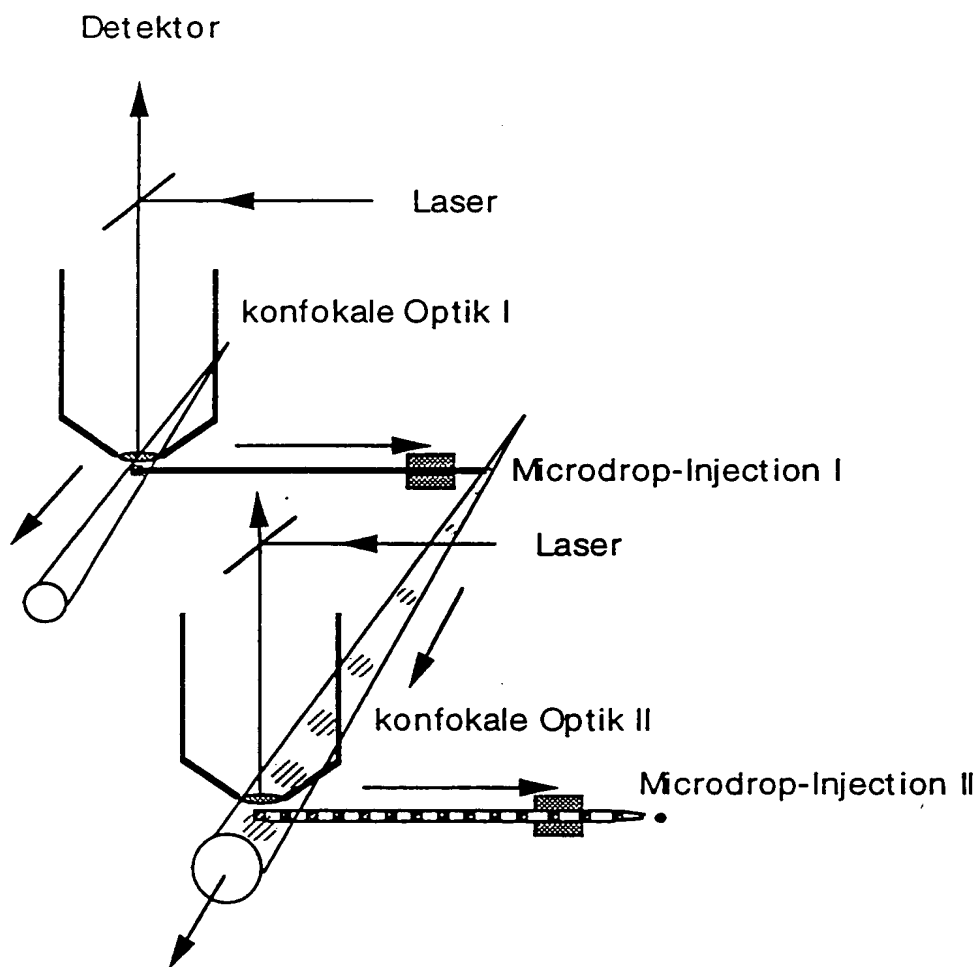
FCS-Selection einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung (FCS-Molekül-Sortierung)



FIGUR 2

3 / 5

Kaskadenanreicherung von FCS- charakterisierten Molekülen, Molekülkomplexen oder Zellen

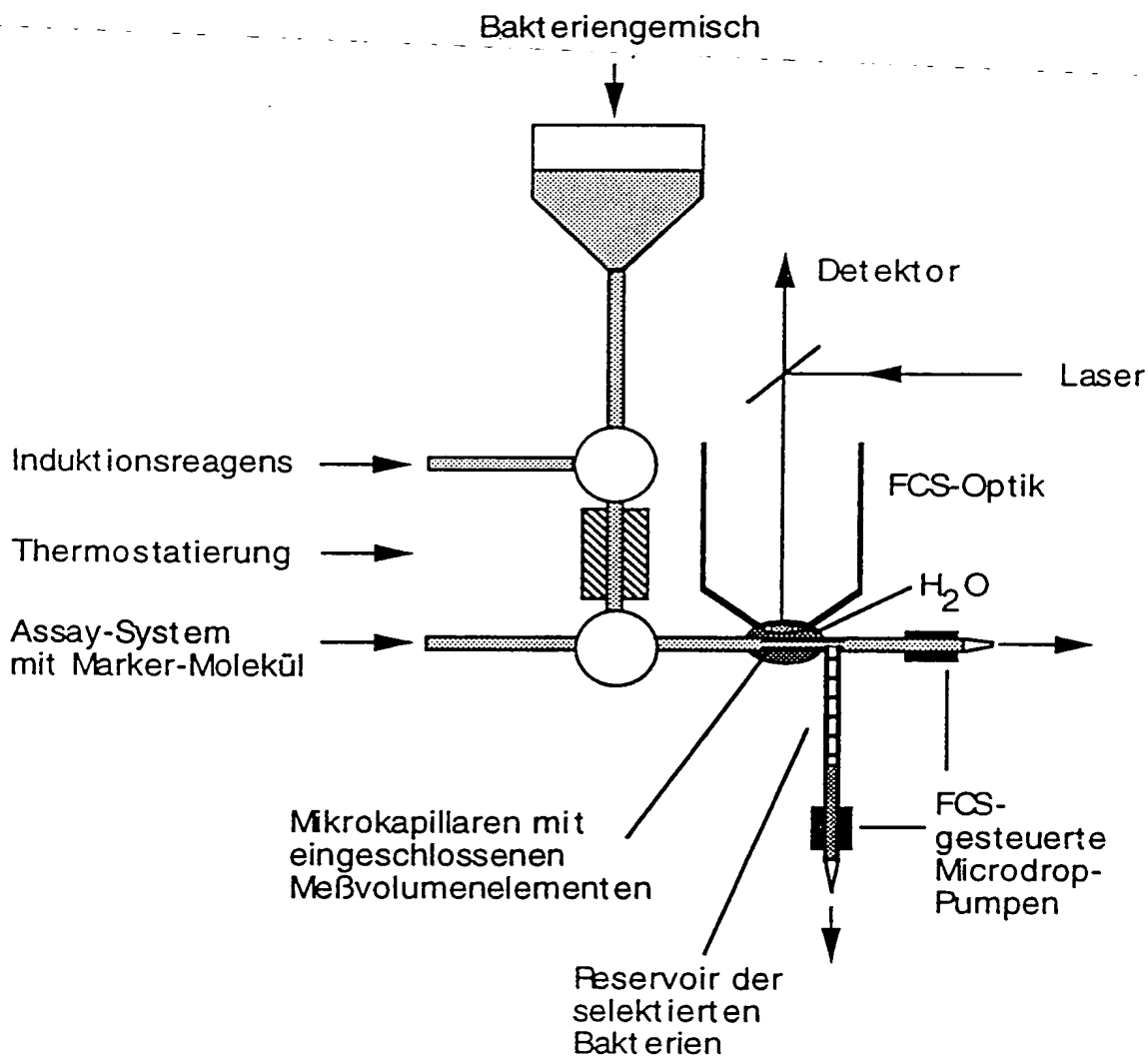


FIGUR 3



4 / 5

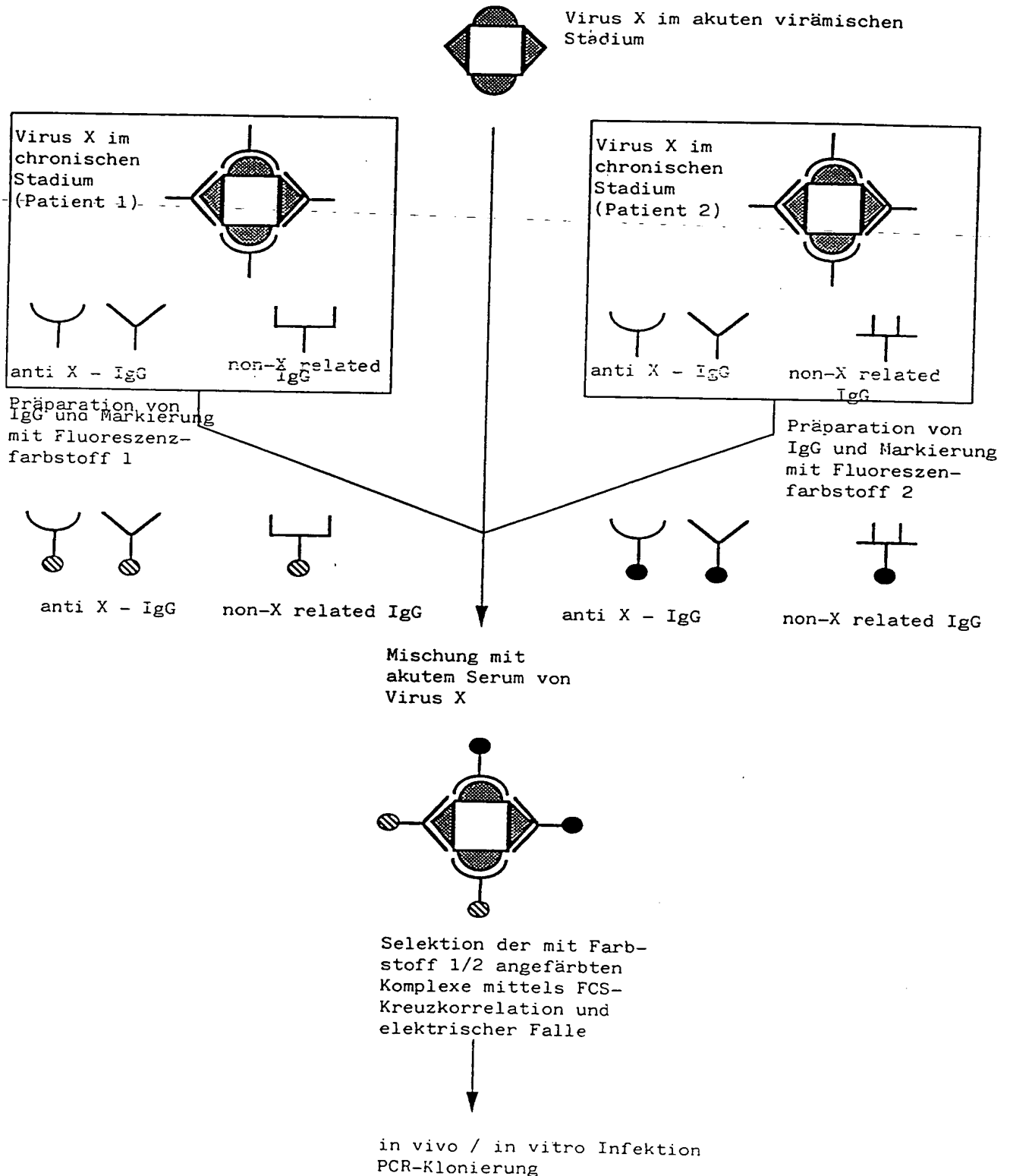
FCS-Selection einzelner Mikroorganismen mit gezielter Fraktionierung



FIGUR 4



5 / 5





1
2
3
4

5
6
7
8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/02344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N1/00 G01N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------

P, X

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF
 SCIENCES OF USA,
 vol.91, no.13, 21 June 1994, WASHINGTON US
 pages 5740 - 5747
 EIGEN ET AL. 'sorting single molecules:
 application to diagnostic and evolutionary
 biotechnology'

1,28-32

X

US,A,4 887 721 (MARTIN ET AL.) 19 December
 1989

1,3-5,
10,15

A

see column 3, line 7-25
 see column 4, line 5-63
 see column 5, line 59 - column 6, line 8
 see column 6, line 22-41

11,28-32

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 December 1995

Date of mailing of the international search report

10. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/02344

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE, vol.330, no.24, 31 December 1987 pages 769 - 771 A. ASHKIN ET AL. 'optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams'	1-5
A	see page 770, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 ---	28-32
A	US,A,5 030 002 (BECTON DICKINSON) 9 July 1991 see column 10, line 49 - column 11, line 10; figures 5,6 ---	1,11,26
A	US,A,4 756 427 (H. GOEHDE ET AL.) 12 July 1988 see column 6, line 49 - column 7, line 52; figures 5,7 ---	1,7
A	US,A,4 784 737 (RAY ET AL.) 15 November 1988 see column 4, line 33 - column 5, line 10 see column 5, line 27-60 ---	1
A	DE,A,37 07 111 (MAX-PLACK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 22 September 1988 see abstract; figure 1 see column 5, line 56-61 -----	1,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/02344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4887721	19-12-89	NONE	
US-A-5030002	09-07-91	EP-A- 0412431 JP-A- 3179237 JP-B- 6040061	13-02-91 05-08-91 25-05-94
US-A-4756427	12-07-88	CA-A- 1256825 EP-A, B 0177718 JP-C- 1833433 JP-A- 61137062	04-07-89 16-04-86 29-03-94 24-06-86
US-A-4784737	15-11-88	NONE	
DE-A-3707111	22-09-88	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N1/00 G01N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd.91, Nr.13, 21. Juni 1994, WASHINGTON US Seiten 5740 - 5747 EIGEN ET AL. 'sorting single molecules: application to diagnostic and evolutionary biotechnology'	1,28-32
X	US,A,4 887 721 (MARTIN ET AL.) 19. Dezember 1989	1,3-5, 10,15
A	siehe Spalte 3, Zeile 7-25 siehe Spalte 4, Zeile 5-63 siehe Spalte 5, Zeile 59 - Spalte 6, Zeile 8 siehe Spalte 6, Zeile 22-41	11,28-32
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Dezember 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. 01. 96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE, Bd.330, Nr.24, 31. Dezember 1987 Seiten 769 - 771 A. ASHKIN ET AL. 'optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams'	1-5
A	siehe Seite 770, Spalte 1, Absatz 3 - Spalte 2, Absatz 1 ---	28-32
A	US,A,5 030 002 (BECTON DICKINSON) 9. Juli 1991 siehe Spalte 10, Zeile 49 - Spalte 11, Zeile 10; Abbildungen 5,6 ---	1,11,26
A	US,A,4 756 427 (H. GOEHDE ET AL.) 12. Juli 1988 siehe Spalte 6, Zeile 49 - Spalte 7, Zeile 52; Abbildungen 5,7 ---	1,7
A	US,A,4 784 737 (RAY ET AL.) 15. November 1988 siehe Spalte 4, Zeile 33 - Spalte 5, Zeile 10 siehe Spalte 5, Zeile 27-60 ---	1
A	DE,A,37 07 111 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 22. September 1988 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1 siehe Spalte 5, Zeile 56-61 -----	1,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/02344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4887721	19-12-89	NONE	
US-A-5030002	09-07-91	EP-A- 0412431 JP-A- 3179237 JP-B- 6040061	13-02-91 05-08-91 25-05-94
US-A-4756427	12-07-88	CA-A- 1256825 EP-A,B 0177718 JP-C- 1833433 JP-A- 61137062	04-07-89 16-04-86 29-03-94 24-06-86
US-A-4784737	15-11-88	NONE	
DE-A-3707111	22-09-88	NONE	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 951019woMehg	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 02344	Internationales Anmeldedatum (Tag; Monat; Jahr) 16/06/95	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag; Monat; Jahr) 17/06/94
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. 2
 - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

TRANSLATION PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 951019woMe/kk	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 95/02344	International filing date (day/month/year) 16/06/1995	Priority date (day/month/year) 17/06/1994
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N1/00		
Applicant EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>7</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14/12/1995	Date of completion of this report 23/09/1996
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP/95/02344

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*

☐ the international application as originally filed.

☒ the description. pages 1 - 23 . as originally filed.
pages _____ . filed with the demand.
pages _____ . filed with the letter of _____
pages _____ . filed with the letter of _____

☒ the claims. Nos. _____ . as originally filed.
Nos. _____ . as amended under Article 19:
Nos. _____ . filed with the demand.
Nos. 1 - 32 . filed with the letter of 27/06/96
Nos. _____ . filed with the letter of _____

☒ the drawings. sheets/fig 1/5 - 5/5 . as originally filed.
sheets/fig _____ . filed with the demand.
sheets/fig _____ . filed with the letter of _____
sheets/fig _____ . filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description. pages _____

☐ the claims. Nos. _____

☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 95/02344V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-32	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are mentioned in this report:

D1 ... Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Vol.91, No.13, 21 June 1994, Washington, USA, pp.5740-5747, Eigen et al: Sorting single molecules: application to diagnostic and evolutionary biotechnology - P document (see Box VI of this report)

D2 ... US-A-4 887 721

D3 ... Nature, Vol.330, No.24, 31 December 1987, pp.769-771, A. Ashkin et al: Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams

D4 ... US-A-5 030 002

D5 ... US-A-4 756 427

D6 ... Weber and Greulich, Int. Rev. Cytol., 1992, 133, pp.1-41

Examples of disclosures of fluorescent correlation spectroscopy:

D7 ... Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 1 "Techniques", edited by Joseph R. Lakowicz. Plenum Press New York and London, 1991, pages 344-345.

D8 ... WO-A-94/16313 - P document (see Box VI of this report) published after the priority dates of this application, but see the search report documents in that document).

2. Claim 1

a. D2 refers to the extraction of a component by a second laser beam (see Abstract). As a video system 42 and a computer are used, which may be considered a system of optical analysis according to claim 1, lines 12-13, information is acquired on the time and place of extraction (see also column 6, lines 34-41). It appears obvious that the extraction volume elements lie within the claimed range.

b. Mention is made in the first paragraph of D3 of the possibility of using a laser beam to extract cells (laser trapping"). The exact time and place of the extraction are available from the video signal. The microscope or video system may be considered an optical analysis system. It would appear obvious from the use of the laser trapping process that the extraction volume elements lie within the claimed range (see also page 769, bottom of the left-hand column).

c. In D4, a tube 93 controlled by driver circuitry 98 is moved in such a way as to extract selected cells (see column 10, lines 49-55 and column 11, lines 42-45). The driver signal contains information on the time of extraction. The place of extraction

is also implicit in this signal. A fluorescence meter is used as an optical analysis system. It seems obvious that the extraction volume elements lie in the claimed range (see dimensions of the tube opening 94, column 10, lines 55-67).

d. D5 discloses a system very similar to the arrangement in D4. It seems obvious that the extraction volume elements lie in the claimed range.

e. D6 (see, for example, figure 2 on page 8) discloses systems for the extraction of cells, and using video and computer equipment (optical analysis system) and providing information about the place and time of extraction. It seems obvious that the extraction volume elements lie in the claimed range because here, too, a laser is used.

Claim 26

To the extent it can be understood, the subject of claim 26 is also devoid of an inventive step in the light of one of the documents D2-D6.

Dependent claims (2-25, 27-32)

The dependent claims apparently include no additional features that involve any inventive step either because they result from the subject of claim 1 or 26 or else they relate to common design processes or applications that a person skilled in the art would use under the given circumstances.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI. Certain published documents

D1 ... Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, Vol.91, No.13, 21 June 1994, Washington, USA, pp.5740-5747, Eigen et al: Sorting single molecules: application to diagnostic and evolutionary biotechnology.

The priority documents were not available at the time of the examination. D1 was published before the second but after the first priority date. D1 seems to contain all the features of claims 1 and 26 - see Abstract, and, for example, on page 5740, the first two paragraphs on the extraction of components and in the middle of page 5741, "For this purpose ..." to the right-hand column, "correlated fluctuations ... within a time interval" in relation to correlation of time and place. D1 also seems to disclose both the claimed element volume and the claimed analysis system, see p.5741, left-hand column).

D8 ... WO-A-94/16313.

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) have not been met as the description made no mention of documents D2 to D5.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Clarity

1. The wording of claim 1, "whereby ... is determined" is incomprehensible. It is unclear what features such a signal has in order to determine the time and place of extraction. Even upon reading the description, very little information is to be found on the nature of this signal or on how it is generated. The term "correlating signal" is unclear.
2. The wording beginning with "especially" has no limiting effect on the claim. In this respect, the special analysis devices referred to are merely optional and should therefore appear as the subject of dependent claims. Furthermore, the last two lines of the claim are very vague. The claimed optical analysis system that "can" analyse specific molecular characteristics could therefore equally be a microscope or a fluorescence metering system.
3. As the wording, "for conducting" in claim 26 has no clear limiting effect, the subject of the device claim is not limited to the process in claim 1. All the features of the apparatus that are necessary for carrying out the process should have been listed. The measuring volume is not part of the apparatus and hence the reference to a dimension of that volume has no limiting effect.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Deichmannhaus am Hauptbahnhof
D-50667 Köln
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 24 July 1995 (24.07.95)		
Applicant's or agent's file reference 951019wo Me/hg		IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP95/02344	International filing date (day/month/year) 16 June 1995 (16.06.95)	
Priority date (day/month/year) 17 June 1994 (17.06.94)		
Applicant EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al		

The applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to the following application(s):

<u>Priority application No:</u>	<u>Priority date:</u>	<u>Priority country:</u>	<u>Date of receipt of priority document:</u>
P 44 22 313.7	17 Jun 1994 (17.06.94)	DE	20 Jul 1995 (20.07.95)
P 44 22 290.4	25 Jun 1994 (25.06.94)	DE	20 Jul 1995 (20.07.95)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

B. Schmitt

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

PATENT COOPERATION TREATY

WO 95/35492
PCT/EP95/02344

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Deichmannhaus am Hauptbahnhof
D-50667 Köln
ALLEMAGNE

ST W G D 2 H HP J NE TW K

08 JAN 1996

17.12.95

17.10.96

IMPORTANT NOTICE

Date of mailing (day/month/year) 28 December 1995 (28.12.95)		
Applicant's or agent's file reference 951019wo Me/hg		
International application No. PCT/EP95/02344	International filing date 16 June 1995 (16.06.95)	Priority date 17 June 1994 (17.06.94)
Applicant EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, BR, CA, CN, CZ, EP, FI, HU, JP, KP, KR, LK, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US, VN

2. In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Offices.
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
28 December 1995 (28.12.95) under No. WO 95/35492

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 730.91.11
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------

Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 28 December 1995 (28.12.95)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 951019wo Me/hg	International application No. PCT/EP95/02344
<p>The designated Office(s) of:</p> <p>AM,AP,BB,BG,BY,EE,GE,IS,KG,KZ,LR,LT,LV,MD,MG,MN,MX,OA,SG,SI,TJ,TM,TT,UA,UG,UZ</p> <p>has (have) waived the requirement for such a communication, but nevertheless a copy of the international application need not be furnished by the applicant to the Office(s) concerned.</p>	

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AM DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: DIE MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDRUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
- PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

An	
Meyers, Hans-Wilhelm VON KREISLER, SELTING & WERNER Bahnhofsvorplatz 1 (Deichmannhaus) D-50667 Köln ALLEMAGNE	
24. SEP. 1996	
F 17.10.96	


Absendedatum (Tag/Monat/Jahr)	23.09.96
----------------------------------	----------

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 951019woMe/kk		WICHTIGE MITTEILUNG	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/02344	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/06/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/06/1994	
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al.			

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
- ERINNERUNG**
Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro mit Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betreffenden ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu dem maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Fax: 522656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter C. Perrinella Tel. 2399/2835
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

22
T

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D	25 SEP 1996
WIPO	PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 951019woMe/kk	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 95/ 02344	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/06/1995	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 17/06/1994
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <div style="text-align: center;">G01N1/00</div>		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geänderte wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt 7 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 14/12/1995	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">23.09.96</div>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465 </div> </div>	Bevollmächtigter Bediensteter <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-family: cursive; font-size: 1.2em;">M.J. LOADES</div> </div> <div style="margin-top: 5px;">Tel. _____</div>

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☐ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☒ der Beschreibung, Seite/n 1-23 _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☒ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.

Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Nr. 1-32 _____, eingereicht mit Schreiben vom 27.06.96.

Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☒ der Zeichnungen, Blatt/Abb. 1/5-5/5 _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.

☐ Ansprüche: Nr. _____.

☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1-32 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche _____	JA
	Ansprüche 1-32 _____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1-32 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. In diesem Bericht sind folgende Dokumente genannt:

D1.....Proceedings of the National Academy of Sciences of USA Bd. 91, Nr. 13, 21 Juni 1994, Washington US Seiten 5740-5747 Eigen et al: Sorting single molecules: application to diagnostic and evolutionary biotechnology - P-Dokument (Siehe Teil VI dieses Berichts)

D2.....US-A-4887721

D3.....Nature Bd. 330, Nr. 24 31 Dezember 1987 Seiten 769-771 A.Ashkin et al: optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams

D4.....US-A-5030002

D5.....US-A-4756427

D6.....Weber und Greulich, Int. Rev. Cytol., 1992, 133, pp. 1-41

Examples of disclosures of fluorescence correlation spectroscopy:

D7.....Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 1

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

"Techniques", edited by Joseph R. Lakowicz. Plenum Press New York and London 1991, pages 344-345

D8.....WO-A-94/16313 - P-Dokument (siehe Teil VI dieses Berichts)(veröffentlicht nach dem Prioritätsdaten der vorliegenden Anmeldung, siehe aber Dokumente des Recherchenberichts dieses Dokuments)

2. Anspruch 1

a. In D2 erfolgt die Entnahme eines Bestandteils durch den zweiten Laserstrahl (siehe Zusammenfassung). Weil ein Videosystem 42 und ein Computer verwendet werden, die als optisches Analysesystem gemäß Anspruch 1, Zeilen 12-13, angesehen werden können, bekommt man Informationen über Ort und Zeit der Entnahme (siehe auch Spalte 6, Zeilen 34-41). Es scheint naheliegend zu sein, daß die Entnahmevolumentelemente im beanspruchten Bereich liegen.

b. Im ersten Absatz von D3 wird erwähnt, daß ein Laserstrahl verwendet werden kann, um Zellen zu entnehmen ("laser trapping"). Die genaue Zeit und der genaue Ort der Entnahme stehen wegen des Videosignals zur Verfügung. Das Mikroskop oder das Videosystem kann als optisches Analysesystem angesehen werden. Wegen der Verwendung des "laser trapping" Verfahrens, scheint es naheliegend zu sein, daß die Entnahmevolumentelemente im beanspruchten Bereich liegen (siehe auch Seite 769, linke Spalte, unten).

c. In D4 wird ein von einer Treiberschaltung 98 gesteuertes Rohr 93 bewegt, um ausgewählte Zellen zu entnehmen (siehe Spalte 10, Zeilen 49-55 und Spalte 11, Zeilen 42-45). Das Treibersignal enthält Information über die Zeit der Entnahme. Der Ort ist auch implizit in diesem Signal enthalten. Ein Fluoreszenzmeßgerät wird als optisches Analysesystem eingesetzt. Es scheint naheliegend zu sein, daß die Entnahmevolumentelemente im beanspruchten Bereich liegen (siehe Dimensionen der Öffnung des Rohres 94, Spalte 10, Zeilen 55-67).

d. D5 offenbart ein System, das der Vorrichtung von D4 sehr ähnelt. Es scheint naheliegend zu sein, daß die Entnahmevolumentelemente im beanspruchten Bereich liegen.

e. D6 (siehe z.B. die Figur 2 auf Seite 8) offenbart Systeme zur Entnahme von Zellen, die auch Video- und Computeranlagen (optisches Analysesystem) besitzen, die Signale mit Information über Zeit und Ort der Entnahme liefern. Es scheint naheliegend zu sein, daß die Entnahmevolumentelemente im beanspruchten Bereich liegen, weil hier auch ein Laser verwendet wird.

Anspruch 26

Soweit er verstanden werden kann, ist der Gegenstand des Anspruchs 26 auch unter Berücksichtigung eines der Dokumente D2-D6 nicht erfinderisch.

Abhängige Ansprüche (2-25, 27-32)

Die abhängigen Ansprüche enthalten offenbar keine zusätzlichen Merkmale, die eine erfinderische Tätigkeit beinhalten, da sie sich entweder aus dem Gegenstand des Anspruchs 1 bzw. 26 ergeben oder sich auf übliche Konstruktionsverfahren oder Verwendungen, die der Fachmann den Umständen entsprechend anwenden würde, beziehen.

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

Anmeldenr.	Veröffentlichungsdatum	Anmeldedatum	Prioritätsdatum
Patentnr.	(Tag/Monat/Jahr)	(Tag/Monat/Jahr)	(zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)

D1.....Proceedings of the National Academy of Sciences of USA Bd. 91, Nr. 13, 21 Juni 1994, Washington US Seiten 5740-5747 Eigen et al: Sorting single molecules: application to diagnostic and evolutionary biotechnology

Bei der Prüfung standen die Prioritätsdokumente der vorliegenden Anmeldung nicht zur Verfügung. D1 ist vor dem zweiten aber nach dem ersten Prioritätsdatum veröffentlicht worden.

D1 scheint alle Merkmale des Anspruchs 1 bzw. 26 zu offenbaren - siehe Zusammenfassung, und z.B. Seite 5740, ersten beiden Absätze für die Entnahme von Bestandteilen, und Seite 5741, Mitte "For this purpose..." bis rechte Spalte "...acquisition", bzw. Seite 5742, rechte Spalte: "correlated fluctuations... within a time interval" für die Korrelation mit Ort und Zeit. D1 scheint auch sowohl das beanspruchte Elementenvolumen als auch das beanspruchte Analysesystem zu offenbaren - siehe S.5741, linke Spalte).

D8.....WO-A-94/16313

2. Nicht-schriftliche Offenbarung (Regel 70.9)

Art der nicht-schriftlichen	Datum der nicht-schriftlichen Offenbarung	Datum der schriftl. Offenbarung, die sich auf die nicht-schriftl.
-----------------------------	----------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Offenbarung

(Tag/Monat/Jahr)

Offenbarung bezieht (Tag/Monat/Jahr)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

Die Erfordernisse der Regel 5.1 (a)(ii) PCT wurden nicht erfüllt, weil in der Beschreibung die Dokumente D1-D5 nicht genannt worden sind.

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

Klarheit

1. Die Formulierung in Anspruch 1 "wobei.... festgelegt wird" ist nicht verständlich. Es ist nicht klar, was für Merkmale ein solches Signal besitzt, um Ort und Zeit der Entnahme festzulegen. Auch wenn man die Beschreibung liest, findet man nur minimale Information über die Natur dieses Signals bzw. wie es geschaffen wird. Der Begriff "korrelierendes Signal" ist nicht klar.
2. Die Formulierung, die mit "insbesondere" anfängt, hat keine einschränkende Wirkung auf den Anspruch. In dieser Hinsicht sind die erwähnten speziellen Analysegeräte nur fakultativ und sollten daher als Gegenstand von abhängigen Ansprüchen erscheinen. Auch sind die letzten zwei Zeilen des Anspruchs sehr vage. Das beanspruchte optische Analysensystem, das spezifische Moleküleigenschaften...analysieren kann könnte daher auch ein Mikroskop oder ein Fluoreszenzmeßsystem sein.
3. Weil die Formulierung "zur Durchführung..." in Anspruch 26 keine klare einschränkende Wirkung hat, ist der Gegenstand des Vorrichtungsanspruchs nicht auf das Verfahren gemäß Anspruch 1 beschränkt. Alle Merkmale der Vorrichtung, die notwendig sind, um das Verfahren durchzuführen, müßten aufgezählt werden. Das Meßvolumen ist nicht Teil der Vorrichtung, daher hat die Bezugnahme auf eine Dimension dieses Volumens keine einschränkende Wirkung.

Ansprüche

1. Verfahren zur Entnahme von einem oder wenigen Bestandteilen eines Systems wie Molekülen, Molekülkomplexen, Vesikeln, Micellen und/oder Zellen, mit einem dazugehörigen Entnahmevolumentelement V , wobei $10^{-9} \geq V \geq 10^{-18}$ l, aus einem die zu entnehmenden Bestandteile enthaltenen Probevolumen durch Transfer des Bestandteiles oder der Bestandteile in eine andere Umgebung, wobei Ort und Zeit der Entnahme durch ein mit dem zu entnehmenden Bestandteil korrelierendes Signal festgelegt werden, welches über ein optisches Analysesystem, insbesondere auf der Basis der konfokalen Laser-Korrelations-spektroskopie oder der Nahfeldspektroskopie, ermittelt wird, das spezifische Moleküleigenschaften in kleinen Volumenelementen von $< 10^{-14}$ l analysieren kann.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Probevolumen mit der anderen Umgebung in Form einer Aufnahmevorrichtung durch eine Pore einer Kapillare oder Membranhaut verbunden ist, deren engste Öffnung D durch $100 \mu\text{m} \geq D \geq 0,1 \mu\text{m}$ gegeben ist.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Entnahme in ein oder mehreren Schritten in ein und dieselbe Aufnahmevorrichtung erfolgt, wobei die einzelnen Entnahmevorgänge jeweils unabhängig voneinander nach Art eines Sammelvorganges erfolgen.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme über einen gerichteten Transport des Volumenelementes durch mindestens einen

elektrischen Spannungs- oder Feldimpuls erfolgt und/oder mechanisch durch mindestens einen Druckdifferenzpuls und/oder durch mindestens einen Lichtdruckpuls.

5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmevorrichtung eine Kapillare ist, deren Lumen größer ist als der Durchmesser der Pore- oder Kapillarenspitze, deren Öffnung mit dem Probevolumen in direktem Kontakt steht.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen elektrischen Feldimpuls über das mindestens einmalige, kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes zum Zweck einer Elektrophorese elektrisch geladener Bestandteile und/oder zum Zweck einer Elektroosmose mit gekoppeltem Transport elektrisch neutraler Moleküle erfolgt, indem eine Elektrode mit der Lösung auf Seiten des Probevolumens elektrisch leitend in Kontakt steht und die andere Elektrode auf Seiten der Aufnahmevorrichtung elektrisch leitend in Kontakt steht mit der Lösung und der leitende Kontakt zwischen beiden Kompartimenten über die Pore hergestellt wird.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Entnahme gezielt über einen mechanischen Druckimpuls durch mindestens einmalige kurzzeitige Erhöhung des Druckes im Volumen außerhalb des Aufnahmekompartimentes im Vergleich zum Druck innerhalb des Aufnahmekompartimentes entsteht und/oder durch kurzzeitige Druckminderung innerhalb des Aufnahmekompartimentes.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Unterdruckpuls durch ein piezo-gesteuertes Dispensiermodul entsteht, dessen Füllvolumen sich innerhalb des Aufnahmekompartimentes befindet und/oder daß der Druckpuls und/oder Unterdruckpuls dadurch erfolgt, daß durch vorzugsweise Schrittmotor gesteuerte Hubänderung einer gekoppelten Kol-

benspritzenvorrichtung das Volumen der Aufnahmevorrichtung vergrößert wird oder das Probenvolumen zugunsten der Aufnahmevorrichtung verkleinert wird.

9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe des aufgenommenen Volumens über die Anzahl der dispensierten Tropfen oder der Schritte des Schrittmotors gesteuert wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das korrelierende Signal den Entnahmezeitpunkt triggert, der in dem Moment erfolgt, wenn sich das oder die zu entnehmende(n) Partikel mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb des Entnahmevolumens befindet oder befinden.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen ein Subvolumen des Probenvolumens ist.
12. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zeitliche und/oder ortsspezifische Korrelation zwischen einer Analyse des Meßvolumens innerhalb des Volumenelementes V und einer Entnahme eines gewünschten Bestandteiles durch Entnahme des Volumenelementes V Rechner/Software-gestützt vorgenommen wird, wobei sich mindestens ein Bestandteil, das im Volumenelement V analysiert wurde, beim Entnahmevorgang im aufgenommenen Volumenelement V befindet, wobei die Pore der Aufnahmevorrichtung mechanisch an das Volumenelement herangeführt wird und/oder das Volumenelement V oder Bestandteile davon mit vorbestimmter zeitlicher Korrelation über einen Transport im Fluß oder über elektrostatische oder magnetische Feldgradienten oder Bestandteile davon an die Pore des Aufnahmekompartimentes zeitlich korreliert transportiert wird und/oder die Analyse geometrisch unmittelbar vor der Pore des Aufnahmekompartimentes erfolgt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen kleiner als das Volumenelement V ist.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die gekoppelten Analyse- und Entnahmevorgänge kaskadenförmig aneinandergereiht werden, wobei die aufgenommenen Probenvolumina mit oder ohne Verdünnungsschritt nachfolgend wiederum einer Analyse ausgesetzt werden und wiederum in angereicherter Form durch eine zweite und/oder weitere Entnahmeeinheit nach erfolgter Analyse entnommen werden können.
15. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile entnommen werden, die mit mindestens einem Reagens einen Komplex bilden, der spektroskopisch erfaßt werden kann.
16. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile entnommen werden, die bislang nicht bezüglich ihrer molekularen Natur bekannt sind, Moleküle, Zellen, Vesikel, Molekülkomplexe, die sich über eine Wechselwirkung mit bekannten Strukturen oder Wirkungen wie enzymatische Wirkung oder eine Komplexbildung identifizieren lassen.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die unbekannten Partikel Pathogene oder Immunogene sind, die gezielt entnommen werden, indem Seren von mindestens einem Organismus gewonnen werden, wobei mindestens ein Serum (Serum 1), aus der Phase einer akuten Infektion durch ein auch bislang nicht identifiziertes (unbekanntes) Pathogen oder Immunogen gewonnen wird und mindestens ein Serum (Serum 2) aus demselben oder mindestens einem weiteren Organismus mit gleicher oder homologer Infektion aus der Phase der chronischen Infektion gewonnen wird, wobei das auch unbekannte Pathogen oder Immunogen aus Serum 1 mit mittelbar oder unmittelbar fluoreszenz-markierten Antikörpern aus Serum 2

zur meßbaren Komplexbildung gebracht wird.

18. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 bis 17 dadurch gekennzeichnet, daß über Kreuzkorrelation die gleichzeitige Bindung von Liganden mit unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen, z. B. markierte Antikörper aus unterschiedlichen Organismen, bestimmt wird.
19. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung der Antikörper unmittelbar über mindestens eine Reaktion mit kopplungsfähigen Farbstoffen oder mittelbar durch Reaktion mit Farbstoffmarkierten, Antikörper-Bindedomänen, insbesondere Protein A-Derivaten oder Protein G-Derivaten erfolgt.
20. Verfahren gemäß mindestens einen der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die auch unbekannten Partikel an sich bekannte Mikroorganismen, oder Vesikel sind, wobei als Merkmal spezifische Wechselwirkungen oder enzymatische Aktivitäten mit fluoreszenz-markierten Zielmolekülen zu oberflächen-exprimierten oder cytosolisch-exprimierten Strukturelementen natürlicher oder genetisch rekombinierter Proteine oder Peptide detektiert werden.
21. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumen sich aus parallel ausgeleuchteten Untermeßvolumina zusammensetzt, wobei die gleichzeitige Ausleuchtung mehrerer Meßvolumina durch mindestens eine Strahlenquelle für elektromagnetische Strahlung durch Verwendung mindestens eines holographischen Gitters erfolgt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Registrierung von Fluoreszenzsignalen aus mindestens einem Meßvolumen durch konfokale Abbildung durch Verwendung einer Mehrzahl konfokaler Lochblenden in Objektebene oder Einkopplung der Signale in Lichtleiter in der Objektebene oder

durch Multiarraydetektoren in Objektebene erfolgt.

23. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 21 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß zur Durchführung parallelisierter Messungen an mindestens zwei Meßvolumina bei der Signalregistrierung in Objektebene mindestens zwei Meßvolumina gemeinsam oder in Gruppen zusammengefaßt auf mindestens ein Detektorelement eines photonenregistrierenden Meßsystems konfokal abgebildet werden.
24. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung fluoreszierender Moleküle in sehr niedriger Konzentration das Probevolumen vor der eigentlichen Messung und Entnahme mindestens eines Bestandteiles einem Scanning-Prozeß unterworfen wird, wobei die Zeit zur Erfassung eines gesuchten Teilchens verkürzt wird, indem die Raumkoordinaten des Meßvolumens relativ zu den Raumkoordinaten des Probevolumens zeitlich diskontinuierlich oder kontinuierlich variiert werden.
25. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Zeitintervall δt für die Messung eines oder mehrerer Volumenelemente mit definierten Raumkoordinaten vor einer Erfassung eines gesuchten Moleküls über sein Fluoreszenz-Meßsignal kürzer ist als die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gesuchten Moleküls innerhalb eines Meßvolumens.
26. Vorrichtung mit einer eine Pore aufweisenden Aufnahmevorrichtung und einer Meßvorrichtung zur Ausleuchtung und/oder Messung eines Meßvolumens durch elektromagnetische Strahlung zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Pore der Aufnahmevorrichtung dicht an das Meßvolumen, welches kleiner als 10^{-14} l, ist, heranführbar ist und die Aufnahmevorrichtung mit einer mechanisch, optisch oder elektrisch steuerbaren Entnahmevorrichtung verbunden ist.

27. Vorrichtung gemäß Anspruch 26, bestehend aus einer Anordnung eines geschlossenen oder offenen Behältnisses zur Aufnahme eines Probevolumens und mindestens einer Verbindung zu mindestens einem zweiten Volumenelement, daß mit dem Probevolumen durch eine Öffnung in direktem Kontakt über eine flüssige Phase steht, wobei die Öffnung dem Meßvolumen vorzugsweise räumlich unmittelbar benachbart ist.
28. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 27, zur präparativen Gewinnung nicht identifizierter Pathogene, Immunogene oder Organismen, die Teile eines Genoms funktional exprimieren.
29. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 25 zur Herstellung genetischer Sonden zur Auffindung/Detektion/Klonierung funktionaler Elemente eines Gesamtgenoms und/oder davon abgeleiteter Diagnostika und/oder Therapeutika.
30. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 25, zur Analyse und präparativen Gewinnung kernhaltiger foetaler Zellen aus mütterlichem Blut.
31. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 25, zur Detektion und präparativen Gewinnung mindestens eines spezifischen Gens eines Mikroorganismus, dessen mindestens ein Genprodukt auf der inneren oder äußeren Zellmembran oder Virushülle präsentiert ist.
32. Verwendung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 25, zur Funktionsbestimmung von Genprodukten definierter Gensegmente.

